

10/598377

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002065

International filing date: 26 February 2005 (26.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 10 2004 010 828.5  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

10/598377

## Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte  
European Patent Attorneys  
European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law  
Technology Law

Leitzstraße 45  
D-70469 Stuttgart  
Telefon: +49 (0)711 99 3 11-0  
Telefax: +49 (0)711 99 3 11-200  
E-Mail: office@gleiss-grosse.com  
Homepage: www.gleiss-grosse.com

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss · Dipl.-Ing. · PA  
Rainer Große · Dipl.-Ing. · PA  
Dr. Andreas Schrell · Dipl.-Biol. · PA  
Torsten Armin Krüger · RA  
Nils Heide · RA  
Armin Eugen Stockinger · RA

PA: Patentanwalt · European Patent Attorney  
European Trademark Attorney

RA: Rechtsanwalt · Attorney-at-law · Admitted for  
Representation at the EU-Trademark Office (OHIM), Alicante

In cooperation with  
Shanghai Zhi Xin Patent Agency Ltd.  
Shanghai · China

## Patentanmeldung

### Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer Zelle

INSILICO biotechnology GmbH  
Allmandring 31

70569 STUTTGART

# Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte

European Patent Attorneys

European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law

Technology Law

## Titel:

Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle

5.

## Beschreibung:

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle sowie Verfahren und Verwendungen dieser Mittel zur Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und zum quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe.

10

Weiter betrifft die vorliegende Erfindung ein Probennahmeverfahren, welches in einem einzigen Schritt die Überführung einer Probe biologischer Zellen aus einem Kulturmedium und die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe bei der Überführung vorsieht, sowie Vorrichtungen zur Durchführung der Probennahme.

15

Vitale biologische Zellen erhalten unter physiologischen Wachstumsbedingungen ihre Zellstruktur aufrecht. Aufgrund der cytoplasmatischen Membran beziehungsweise Membranen weiterer Zellkompartimente werden aus vitalen biologischen Zellen nur Stoffwechselendprodukte oder Botenstoffe, in der Regel nicht aber hauptanteilig die in der Zelle enthaltenden Inhaltsstoffe, insbesondere Metabolite, in die Zellumgebung abgeben. Metabolit ist jede im biologischen Stoffwechsel auftretende, im Wesentlichen niedermolekulare Substanz. Sie ist zu unterscheiden von den so genannten Biopolymeren wie Proteinen, DNA-Molekülen, mRNA-Molekülen und anderen, wobei deren Vorstufen, Abbau-, Spalt- und Bildungsprodukte jedoch wiederum den Metaboliten zuzurechnen sind.

20

25

Um Zellinhaltsstoffe und insbesondere Metabolite aus biologischen Zellen zu gewinnen, werden im Stand der Technik einige Verfahren seit langem unverändert angewandt, die jedoch gravierende Nachteile aufweisen.

Bei etablierten Verfahren wird in der Regel die zelluläre Integrität zerstört. Hierunter fallen beispielsweise die Metabolit-Freisetzung mittels Ultraschall, mechanische Zellaufschlussverfahren (z.B. Rührwerkskugelmühle) oder auch der lange bekannte Einsatz von kochendem Wasser oder von überkritischen Lösungen, zum Beispiel im Autoklaven. Biologischen Zellen setzen bekanntermaßen durch lange Erhitzung in kochendem Wasser Makromoleküle wie Plasmid-DNA in die Kulturlösung frei (Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (1994) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2. ed., Cold Spring Harbor).

15 Andere bekannte Methoden zur Metabolit-Freisetzung, beispielsweise der Einsatz von chemischen Lösungsmitteln, Säuren, Laugen und unpolaren Lösungsmitteln, modifizieren die Zusammensetzung der Proben-Suspension derart, dass anschließend ausgewählte Detektionsmethoden, wie die Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen durch enzymatische Assays, nicht mehr eingesetzt werden können. Oder aber werden durch die chemischen Lösungsmittel Fällungsreaktionen beziehungsweise chemische Reaktionen der Metabolite angeregt, die zu einer Verfälschung von Mess- und Analyseergebnisse führen. Wünschenswert sind daher Zellaufschlussverfahren, bei deren Anwendung die freigesetzten Inhaltsstoffe, insbesondere die Metabolite, im Wesentlichen unverändert erhalten werden können. Weitere bekannte Aufschluss- beziehungsweise Lyseverfahren sind die Einwirkung chemischer Reagenzien sowie Gefrier-Tau-Zyklen.

25

Bei diesen Vorgehensweisen werden die biologischen Zellen thermisch, chemisch und/oder mechanisch belastet und verlieren ihre zelluläre strukturelle

Integrität beziehungsweise Zellstruktur, das heißt sie lysieren. Die Zellwand und die Cytoplasmamembran werden dabei zerstört und die Inhaltsstoffe werden freigesetzt. Dabei bilden sich auch Zelltrümmer in Form von beispielsweise Micellen, nackter DNA und Proteinkomplexen.

5 Nach derartigem Vorgehen liegen nach der Zelllyse nachteilhafterweise in der Zellsuspension neben den interessierenden freigesetzten Inhaltsstoffen auch Zelltrümmer, nackte DNA und Proteinkomplexe vor. Die Gegenwart dieser Komponenten ist beim Nachweis und der Analyse der Inhaltsstoffe, insbesondere der Metabolite, meist störend. Daher sind der Zelllyse nachfolgende Reinigungsschritte wie insbesondere chromatographische und/oder elektrophoretische Auftrennungen erforderlich, um die Inhaltsstoffe, insbesondere die Metabolite, in zweckmäßiger Reinheit zu erhalten. Dies ist insbesondere für die weitere Verarbeitung beziehungsweise zum Nachweis oder Analyse erforderlich, um beispielsweise eine spezifische Analyse der Metabolite mittels chromatographischer, enzymatischer beziehungsweise massenspektroskopischer Methoden zu ermöglichen.

15 Ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von Inhaltsstoffen, insbesondere von Metaboliten, aus biologischen Zellen, welches insbesondere einfach durchzuführen und die Kontamination der freigesetzten Inhaltsstoffe mit störenden Komponenten wie Zelltrümmer, nackte DNA und Proteinkomplexe minimiert ist, ist daher wünschenswert.

Weiter sind Probennahmeverfahren, insbesondere zum Überführen von Proben biologischer Zellen aus Kultivierungsgefäßen, beispielsweise einem Bioreaktor, in ein Probengefäß bekannt. Solche Probennahmeverfahren dienen in erster Linie zur Erforschung physiologischer Parameter biologischer Zellen und zur Analyse der Prozessführung in der Biotechnologie und der Bioverfahrenstechnik. Folgende Parameter sind dabei erstrebenswert: (1) eine möglichst schnelle Überführung von Zellsuspension aus einem Zellkultivierungssystem in ein Probennahmegeräß, um gegebenenfalls eine hohe Probennahmefrequenz zu ermöglichen ("Transfer"); (2) die prompte Abstoppung des Metabolismus, damit die interessierenden Metabolite nicht durch enzymatische Reaktionen

weiter umgesetzt werden ("Quenching"); (3) die möglichst vollständige Freisetzung der Metabolite aus den Zellen durch Anwendung verschiedener Aufschlussverfahren ("Aufschluss"); (4) die in der Probenlösung enthaltenen Metabolite müssen von Zelltrümmern und nicht lysierten Zellen getrennt werden ("Abtrennung"); optional müssen (5) für eine quantitative Biologie weitere Randbedingungen wie die Berücksichtigung der Stabilität von Metaboliten in den durchlaufenen Schritten sowie deren Freisetzungsgrade beziehungsweise deren Adsorptionsverhalten an Komponenten der Zellsuspension und Hilfsmaterialien eingehalten werden ("Quantifizierbarkeit").

Ein schnelles Probennahmeverfahren wurde von Theobald und Mitarbeitern (*In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique*. Anal Biochem. (1993) 214:31-7) entwickelt. Diese Probennahme besteht aus einer dünnen Edelstahlkapillare (Innendurchmesser 0,7 mm) und einem Kugelhahn. Konstruktive Maßgabe war die 15 Minimierung des Totvolumens (200  $\mu$ l), da die Probennahme durch diskretes Öffnen/Schließen des Hahns erfolgt. Bei einem Gesamtvolumen von ca. 5 ml je Probe ist das Totvolumen vernachlässigbar klein. Diese Probennahme integriert weder Schritte zum Abstoppen des Metabolismus noch zur Metabolitextraktion. Auch sind diskrete Öffnungs-/Schließvorgänge des Kugelhahns ohne jede Automatisierung vorgesehen. Die Zellsuspension wird durch vakuumierte Proberöhrchen gefördert (Vakuumpumpe,  $8 \times 10^{-3}$  mbar), die Probennahmefrequenz beträgt, da manuell, nur ca.  $0,2 \text{ s}^{-1}$ .

Eine Weiterentwicklung ist die von Lange und Mitarbeitern (*Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae**. Biotechnol. Bioeng. (2001) 75:406-15.) verwendete Probennahme. Eine 25 Reduzierung des effektiven Totraumvolumens auf 50  $\mu$ l pro Probennahme wird durch den Einbau einer Bypassleitung und Ansteuerung je eines Ventils für die Probennahme- bzw. die Bypassleitung erreicht. Durch schnelle Ventilumschaltung zwischen diesen beiden Leitungen kann so verhindert werden, dass Probe aus dem Totraum gezogen wird. Außerdem wird der Verlust an 30

Probe minimiert. Die geometrischen Abmessungen (Innendurchmesser der Kapillare: 1,0 mm, Länge: 80 mm) sind vergleichbar der Probennahme von Theobald. Die Förderung der Zellsuspension erfolgt ebenfalls diskret durch ein Vakuum in den versiegelten Reagenzgläsern (Vakuumpumpe). Die Probennahmefrequenz ist ebenfalls niedrig und beträgt ca.  $1,5 \text{ s}^{-1}$  allein für die Fluidförderung. Dieser Wert für die Probennahmefrequenz berücksichtigt allerdings nicht die Zeit für die Ausbildung des Vakuums (ca. 1 s) sowie die für den manuellen Wechsel der einzelnen Reagenzgläser benötigte Zeit.

5 In den bekannten Probennahmeverrichtungen findet sowohl das Abstoppen des Metabolismus als auch die Metabolitextraktion in konstruktionstechnisch getrennten Einheiten statt, und damit zeitlich getrennt und nicht integriert während der Probennahme und durch das Probennahmesystem selbst. Dabei sind Quenching und Metabolitfreisetzung teilweise getrennte Prozessschritte, teilweise aber auch durch chemische Einwirkungen einer zweiten Phase (z. B. Säuren, Basen, flüssigen Stickstoff, tiefgekühltes Methanol) in einem Schritt zusammengefasste Operationen.

15 Aus der DE 4407439 A1 ist ein „Verfahren und Vorrichtung zur Serienprobennahme biologischer Proben“ bekannt, worin halb-kontinuierlich eine Probe in eine Polypropylen-Rohrwendel (Innendurchmesser: 8 mm, Länge: 100 m, Wendeldurchmesser: 0,5 m) gezogen wird bis diese mit Zellsuspension und parallel zudosierter Perchlorsäure (35% w/v, bei  $-25^\circ\text{C}$ ) gefüllt ist. Durch die Perchlorsäure erfolgt eine sofortige Inaktivierung des Metabolismus bei gleichzeitiger Zerstörung der Zellstruktur und Freisetzung der Metabolite. Wenn die Rohrwendel gefüllt ist, wird diese bei  $-80^\circ\text{C}$  gefroren. Diese kann dann in Stü-  
25 cke zerteilt aufgetaut werden, wobei sich die Lage eines Probesegments im Schlauch zum Beispiel mit einem bestimmten Zeitpunkt der Änderung der Kultivierungsbedingung, wie der dynamischen Anregung (z.B. pulsartige Erhöhung der Glucosekonzentration in glucoselimitierter Kultur), korrelieren lässt.

Eine kontinuierliche Probennahme wird in der DE 19705289 A1 beschrieben. Die Probennahme erfolgt kontinuierlich, ein gleichzeitiges Quenching sowie die Freisetzung von Metaboliten dadurch ist aber nicht vorgesehen.

5 Somit sind die wesentlichen Grundanforderungen an jedes Quenching-, Aufschluss- und Abtrennungsverfahren (i.) ein möglichst schnelles Abstoppen des Metabolismus, das heißt vollständige, irreversible Inaktivierung/ Denaturierung der Enzyme beziehungsweise deren sofortige Abtrennung, (ii.) eine reproduzierbare, daher in der Regel möglichst vollständige Zerstörung der Zellstruktur bzw. Permeabilisierung der Zellmembran zur vollständigen Freisetzung der Metabolite aus den Zellen, (iii.) eine leichte Abtrennung von Metaboliten, Zellteilen und Zellen. Weiter dürfen (iv.) die zu untersuchenden Metabolite durch die Maßnahmen (i.) bis (iv.) in ihrer strukturellen Integrität (chemischen Struktur) nicht dermaßen beeinflusst werden, dass keine eindeutige Identifikation und Analyse mehr möglich ist. Ferner muss für eine quantitative Analyse in den einzelnen Schritten eine reproduzierbare Freisetzung und eine negative Beeinflussung der Messung durch ein nicht reproduzierbares Adsorptionsverhalten der Metabolite an Hilfsmitteln vermieden werden.

15 Typischerweise umfassen die Verfahrensschritte Quenching/Aufschluss/Abtrennung Zwei-Phasen-Systeme zum Quenching und Aufschluss, Filtration und Zentrifugation zur Abtrennung. Ein Abstoppen des Metabolismus kann zum einen durch chemische Reagenzien erfolgen, zum anderen durch Anwendung eines Temperaturgradienten.

25 Nach Theobald et al. (s.o.) wird in versiegelte Reagenzgläser unter Vakuum Perchlorsäure (35% w/v bei -20°C) vorgelegt, nutzt also Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wässriger Lösungen zum Abstoppen des Metabolismus bei überlagerter Extraktion mittels gekühlter Perchlorsäure. Weiterhin wurden drei Gefrier-Tauzyklen durchgeführt (durch Eiskristallbildung wird die Zellwand dabei permeabilisiert). Vor der Analyse müssen die Proben neutralisiert

werden, wobei der sich bildende  $\text{KClO}_4$ -Niederschlag in einem Filtrationsschritt beseitigt wird.

5

Nach Lange et al. (s.o.) werden ebenfalls Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wässriger Lösungen eingesetzt, wobei 5 ml Methanol (-40°C) als Quenchingmittel vorgelegt werden. Die Metabolitextraktion erfolgt in dem durch Zentrifugation erhaltenen Zellpellet durch kochendes Ethanol.

10

Gemäß DE 19705289 A1 wird eine Methanolmischung bei -50°C als Quenchingflüssigkeit mit anschließender Zentrifugation (-20°C), Resuspension des mit Perchlorsäure und einem Gefrier-Tauzyklus (-80°C) zur Metabolitextraktion, Neutralisierung der Lösung und erneuter Zentrifugation zur Entfernung des Niederschlags eingesetzt.

15

Weiter werden flüssiger Stickstoff in Verbindung mit Gefrier-Tauzyklen zum Quenchen beziehungsweise Extrahieren verwendet sowie anstelle von kochendem Ethanol auch kochendes Wasser (Bhattacharya, Fuhrman, Ingram, Nickerson, Conway. Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* (1995) 232:98-106).

20

25

Weiter sind Vorrichtungen bekannt, die dem Bauprinzip eines Wärmetauschers entsprechen. Sie werden insbesondere als Sterilisationseinheiten zur thermischen Behandlung kleiner Volumenströme eingesetzt. Aus der EP 0722075 A1 ist eine kontinuierlich zu betreibende Sterilisationseinheit für den Labor-/Technikumsmaßstab bekannt. Dabei wird der Gesamtvolumenstrom in mehrere gleichlange Rohre über aufwändig gestaltete Verteilerblenden symmetrisch aufgeteilt. Zur Sterilisation ist die Kurzzeiterhitzung bei ca. 140°C vorgesehen.

Ein dampfbeheizter Wärmeaustauscher ist aus der DE 2345342 A1 bekannt. Charakteristisch ist der optimierte Wärmeübergang durch wendelförmige Strömumsgsführung und geometrische Veränderung der Strömungsquerschnitte.

Aus der WO 92/16807 ist eine Vorrichtung bekannt, die ebenfalls zur Vergrößerung der Oberfläche und Optimierung der Strömungsverhältnisse Rohrwendeln verwendet und als Besonderheit Flüssigkeitsinjektoren aufweist. Diese sorgen für zusätzliche Verwirbelung und damit einen verbesserten Wärmeübergang.

5 Die Kurzzeiterhitzung biologischer Proben durch Mikrowellen ist ebenfalls bekannt, beispielsweise aus der EP 0217662 A1. Beschrieben sind sowohl das Verfahren der Sterilisation mittels Mikrowellen, als auch die hierfür erforderliche Vorrichtung.

10

Keine dieser bekannten Vorrichtungen ist eine Zellkonditioniereinrichtung und wird für die Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen, insbesondere Metabolite, biologischer Zellen eingesetzt.

15

Ausgehend vom Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Verfahren für die Konditionierung biologischer Zellen sowie Mittel dazu bereitzustellen, die im Wesentlichen die verbesserte Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und insbesondere einen verbesserten quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe ermöglicht.

20

Das technische Problem wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, wobei die Zelle bei einer Kultivierungstemperatur  $T_M$  in einem Kulturmedium kultiviert wird und anschließend für eine Konditionierzeit  $t_h$  bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  konditioniert wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass dabei das aus der Kultivierungstemperatur  $T_M$ , Konditioniertemperatur  $T_K$  und Konditionierzeit  $t_h$  gemäß der Formel

25

$$WE = t_h \cdot (T_K - T_M)$$

errechnete Wärmeäquivalent  $WE$ , Werte von  $70 \text{ K} \cdot \text{s}$  bis  $300 \text{ K} \cdot \text{s}$  annimmt.

Das heißt, die Parameter Kultivierungstemperatur  $T_M$ , Konditionierungszeit  $T_K$  und Konditionierzeit  $t_h$  werden gemäß der Erfindung stets so gewählt, dass das errechnete Wärmeäquivalent  $WE$  von  $70 \text{ K} \cdot \text{s}$  bis  $300 \text{ K} \cdot \text{s}$  beträgt.

5 Eine wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Wärmebehandlung von Zellen zur vollständigen Freisetzung von Metaboliten ohne die Zerstörung der strukturellen Integrität der Zellen. Strukturelle Integrität der Zelle bedeutet die Beibehaltung der Hülle der Zelle in einem Stück und keine Bildung von Bruchstücken daraus. Damit findet auch keine signifikante Bildung von Zellfragmenten statt (subzelluläre Partikel wie Micellen aus der Cytoplasma-membran, nackte DNA-Bruchstücke, mRNA, Proteinkomplexe). Durch das einfache Durchlichtmikroskop bei einer 500fachen Gesamtvergrößerung (Okular x Tubus x Objektiv =  $10 \times 1.25 \times 40$ ) betrachtet, sind beispielsweise vollständig intakte *E. coli*-Zellen und *E. coli*-Zellen mit struktureller Integrität in ihrer Größe nicht unterscheidbar.

15 Die Erfinder fanden überraschend, dass durch die erfindungsgemäße thermische Konditionierung in einem durch das Wärmeäquivalent  $WE$  vorgegebenen engen Temperaturbereich und dem genau darauf abgestimmten Zeitintervall die Freisetzung der zellulären Inhaltsstoffe, insbesondere der Metabolite, erreicht wird, wobei gleichzeitig, besonders vorteilhaft, die Zellstruktur der thermisch konditionierten biologischen Zelle erhalten bleibt. Im Wesentlichen liegen nach dem erfindungsgemäßen thermischen Konditionieren neben den freigesetzten Inhaltsstoffen, insbesondere den Metaboliten, „entleerte“ Zellhüllen mit intakter Struktur vor. Das Auftreten von Zelltrümmern und weiteren störenden Komponenten ist vermindert und wird bei zweckmäßiger Wahl der Parameter und je nach Anwendungsgebiet sogar ganz verhindert. Besonders vorteilhaft ist eine einfache und effiziente Abtrennung dieser Zellhüllen mit intakter Struktur von den Metaboliten mittels einfacher Filtration und/oder Zentrifugation möglich. Dadurch wiederum wird, besonders vorteilhaft, eine sich insbesondere unmittelbar an die Konditionierung anschließende quantitative und/oder quali-

25

tative Analyse der intrazellulären Metabolite, ohne weitere aufwändige Zwischenstufen, ermöglicht.

5 Anwendungsgebiete der erfindungsgemäß technischen Lehre sind insbesondere Verfahren und Vorrichtungen zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in verschiedenen Zellsystemen wie Mikroorganismen, Pilzen oder Zellkulturen tierischer, menschlicher, pflanzlicher Zellen bei Züchtung in Kultivierungssystemen wie Bioreaktor, Schüttelkolben, Proberöhrchen oder Micromitterplatten.

10 Untersucht werden können gemäß der Erfindung sowohl stationäre als auch nicht stationäre physiologische Zustände der biologischen Zelle(n). Der Metabolismus kann dabei schnellstmöglich abgestoppt werden. Die selektive Metabolitfreisetzung durch die erfindungsgemäß thermisch konditionierten Zellen ermöglicht die einfache Probenaufarbeitung und Aufreinigung für die Analyse.

15 So wird beispielsweise bei der Durchführung enzymatischer Assays und der Bestimmung der Lichtstreuung und -absorption im Photometer die bei bekannten Freisetzungsverfahren durch das Ausfallen bestimmter Zelltrümmer und anderer störender Komponenten im Medium unvermeidliche Trübung der Probenlösung, wie sie bei der vollständigen Zerstörung der Zellstruktur und der subsequenten Abtrennung durch Filtration beobachtet wird, vermieden. Bei chromatographischen Methoden, beispielsweise bei der HPLC-Analyse, wird die Blockade der HPLC-Säule durch große Zelltrümmer vermieden.

25 In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäß Verfahrens beträgt die Konditioniertemperatur  $T_K$  von 65°C bis 105°C, bevorzugt von 80°C bis 95°C. Insbesondere werden die vorteilhaften Effekte bei einem Temperaturbereich von 80°C bis 95°C erreicht, jedoch wird auch bei davon abweichenden Werten der Konditioniertemperatur nach oben oder nach unten, je nach Zweck der Anwendung und Anwendungsgebiet ein vorteilhafter Effekt erreicht. Die im Einzelfall einzusetzende Konditioniertemperatur wird der Fachmann aufgrund

seines Fachwissens leicht finden können. In einer bevorzugten Variante liegt die Konditioniertemperatur  $T_K$  stets unter dem Siedepunkt des Kulturmediums. Gemäß der Erfindung wird bevorzugt - und im Gegensatz zum Stand der Technik - ein Sieden des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmediums stets vermieden.

5

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Konditionierzeit  $t_h$  von 0,5 s bis 600 s, bevorzugt von 1 s bis 180 s. Auch hier werden die vorteilhaften Effekte insbesondere bei einer Konditionierzeit  $t_h$  von 0,5 s bis 600 s erreicht. Jedoch wird auch bei davon abweichenden Werten der Konditionierzeit nach oben oder nach unten, je nach Zweck der Anwendung und Anwendungsbereich eine vorteilhafte Effekt erreicht. Die im Einzelfall einzusetzende Konditionierzeit wird der Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht finden können.

15

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Kultivierungstemperatur  $T_M$  von 26°C bis 42°C, bevorzugt von 30°C bis 38°C. Die im Einzelfall einzusetzende Kultivierungstemperatur  $T_M$  der biologischen Zellen wird der Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht finden können.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nimmt das aus den Parametern Kultivierungstemperatur  $T_M$ , Konditioniertemperatur  $T_K$  und Konditionierzeit  $t_h$  gemäß der Erfindung errechnete Wärmeäquivalent **WE** Werte von 90 K· s bis 150 K· s an.

25

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines gram-negativen Prokaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent **WE**  $110 \pm 20$  K· s beträgt. Ein Beispiel für den gram-negativen Prokaryonten ist das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*).

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines Eukaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent  $WE = 110 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$  beträgt. Ein Beispiel für den Eukaryonten ist der Pilz *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

5

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines gram-positiven Prokaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent  $WE = 130 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$  beträgt. Ein Beispiel für den gram-positiven Prokaryonten ist das Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*).

15

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei das Kulturmedium ein flüssiges Medium ist und das thermische Konditionieren dadurch erfolgt, dass das die biologische Zelle enthaltende flüssige Medium in einer Kapillare fließt, wobei sich die Zelle für eine Konditionierzeit  $t_h$  innerhalb einer auf die Konditioniertemperatur  $T_K$  temperierten Kapillarstrecke der Kapillare befindet. So wird erfindungsgemäß bevorzugt das entsprechende zweckmäßige Wärmeäquivalent übertragen und die biologischen Zellen gemäß der Erfindung thermisch konditioniert. In einer bevorzugten Variante beträgt der Volumenstrom in der temperierten Kapillarstrecke von 0,5 ml/s bis 12 ml/s. Besonders bevorzugt beträgt der Volumenstrom von 2,5 ml/s bis 8,0 ml/s.

25

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei der Schritt der thermischen Konditionierung mit der Überführung des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmediums aus einem Kultivierungsgefäß, insbesondere einem Bioreaktor, in ein Auffanggefäß, insbesondere ein Probensammelgefäß, durchgeführt wird. Dadurch wird vorteilhaft eine schnelle Überführung von beispielsweise Zellsuspension aus einem Zellkultivierungssystem in ein Probennahmegeräß, die prompte Abstoppung des Metabolismus in der Zelle und gleichzeitig die Freisetzung der Metabolite aus den Zel-

len in einem einzigen Verfahrensschritt der an die Probenüberführung gekoppelten thermischen Konditionierung der biologischen Zellen erreicht. Besonders vorteilhaft wird so gemäß der Erfindung eine sich an diese Probenüberführung unmittelbar anschließende quantitative und/oder qualitative Analyse der freigesetzten oder des speziellen interessierenden Metaboliten sowie deren oder dessen Isolierung und Gewinnung ermöglicht. Insbesondere steht der Metabolit nach der an die Probenüberführung gekoppelten thermischen Konditionierung bereits nach einfacher Filtration oder Zentrifugation in zweckmäßig hoher Reinheit zur Verfügung. Auf aufwändige Reinigungsschritte kann verzichtet werden, so dass sowohl eine zeitnahe kontinuierliche Analyse beziehungsweise Gewinnung der Metabolite, als auch eine hohe Probennahmefrequenz realisiert werden kann. Außerdem kann ein hoher Probendurchsatz in gleich bleibender, von wenigen Faktoren abhängiger Qualität erzielt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Gewinnung sowie die quantitative und qualitative Analyse beziehungsweise den quantitativen und qualitativen Nachweis der in der biologischen Zelle enthaltenen Inhaltsstoffe, insbesondere mindestens eines intrazellulären Metaboliten. Dieses ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe der Metaboliten, bestehend aus Aminosäuren, Aminen und deren Derivate, Carboxylsäuren, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Phosphatestern (ohne die Nukleinsäuren), Nukleinsäuren und verwandten Verbindungen, Zuckern und verwandten Verbindungen, Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Vitaminen, Coenzymen und anorganischen Ionen.

Die mittels der nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen, quantitativ bestimmten beziehungsweise qualitativ nachgewiesenen Metabolite sind insbesondere:

**Metaboliten-Klasse:**

Aminosäuren, Amine und deren Derivate

**konkrete Metabolite:**

Alanin, Glutamat

Carboxylsäuren	Pyruvat, Citrat, Isocitrat, Oxoglutarat, Oxaloacetat, Malat, Fumarat, Succinat, Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat
Alkohole	Ethanol
Aldehyde	Glycerinaldehydphosphat
Phosphatester (ohne Nukleinsäuren)	ppGpp, NAD, NADP, NADH, NADPH,
Nukleinsäuren und verwandte Verbindungen	Adenosinmonophosphat, Guanosintriphosphat, Uridindiphosphat, cAMP
Zucker und verwandte Verbindungen	Glucosephosphat, Fructosephosphat, Fructosebisphosphat, Phosphogluconat, Ribose- und Ribulosephosphat, Erythrosephosphat, Sedoheptulosephosphat, Dihydroxyacetophosphat
Lipide, Steroide und Fettsäuren	Acetyl-CoA
Vitamine und Coenzyme	Riboflavin
Anorganische Ionen	Phosphat

Weitere gemäß der Erfindung aus biologischen Zellen gewinnbare beziehungsweise isolierbare, quantitativ bestimmmbare beziehungsweise qualitativ nachweisbare Metabolite sind: Aminobutanoat, Acetoacetat, Acetoacetyl-CoA, Acetaldehyd, Acetyl-L-carnitin, Acetyl-CoA, Acetate, Acetyladenylat, Acetohydroxybutanoat, S-Acetyl dihydrolipoamide, N-Acetylglutamat, N-Acetylglutamatphosphat, N-Acetylglutamatsemialdehyd, O-Acetylhomoserin, 2-Acetolactat, N2-Acetylornithin, Acetylphosphate,

N-Acetylglucosamin, N-Acetylglucosaminphosphat, Acylglycerol, 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphat, 1-Acylglycerophosphocholin, 1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, N-Acetylmannosamin, N-Acetylmannosaminphosphat, 2-Amino-3-carboxymuconatsemialdehyd, N-Acetylneuraminat, N-Acetylneuraminat-9-phosphat, Adenin, Adenosin, Adenylosuccinat, Adenylylsulfat, Adenylosuccinat, Adenosindiphosphat, ADP-Ribose, ADP-Ribosephosphat, 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-formamido-4-imidazolecarboxamid, Alcar, Aminoimidazolribitol, Ketoglutarat, Ketovalin, Alanin, Aminoacetoacetat, Aminoaceton, Aminoadipat, Aminoadipatadenylat, Aminoadipatsemialdehyd, Aminobenzoat, Aminolevulinat, Adenosinmonophosphat, 2-Aminomuconat, 2-Aminomuconatsemialdehyd, Arginin, (N-Omega-L-arginino)Succinat, Arogenat, S-Adenosylmethioninamin, Asparagin, Aspartat, Asparagin, Aspartylphosphat, Aspartatsemialdehyd, Adenosintriphosphat, Betain, Betainaldehyd, CMP-N-Acetylneuraminat, cAMP, Carnitin, N-Carbamoyl-L-Aspartat, Carbamoylphosphat, Cardiolipin, Cytidindiphosphat, CDP-Cholin, CDP-Diacylglycerol, CDP-Ethanolamin, Ceramid, cGMP, Cholesterin, Cholesta-7,24-dien-3-betaol, Cholin, Cholinphosphat, Chorismat, 3-Carboxy-1-hydroxypropyl-ThPP, Aconitat, Methylaconitat, Citrat, Citrullin, Cytidinmonophosphat, Coenzym A, Coenzym Q, Kreatin, Phosphokreatin, Crotonoyl-CoA, Cytidintriphosphat, Cystein, Cystathion, Cystin, Cytidin, Deoxyadenosin, Deoxyadenosindiphosphat, Deamino-NAD, Deoxyadenosin-monophosphat, Deoxyadenosintriphosphat, Deoxycytidindiphosphat, Deoxycytidinmonophosphat, Deoxycytidintriphosphat, Cytidin, Demethyllanosterol, 4,4-Dimethyl-5-cholesta-8,14,24-trien-3-betaol, 25 Deoxyguanosindiphosphat, Deoxyguanosinmonophosphat, Deoxyguanosintriphosphat, Deoxyguanosin, Dihydroxyacetophosphat, Dehydrocholesterin, Dihydrofolat, Dihydrolipoamid, Dihydronoopterin, (S)-Dihydroorotat, Dihydropteroat, Dihydrobiopterin, Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridin, 2-Amino-7,8-dihydro-4-hydroxy-6-(diphosphooxymethyl)pteridin, 33-Dehydroquina, Dehydrosphinganin, Diacylglycerol, Diacylglycerolphosphat, Dimethylglycin, Deoxyinosin,

Dimethylallyldiphosphat, Dimethylglycin, N-Acetyl-D-glucosaminyl-diphosphodolichol, N,N'-Chitobiosyldiphosphodolichol, Dolichol, Dolichylphosphat, Dolichyldiphosphat, Dehydropantoat, Dephospho-CoA, 2-Deoxy-D-ribosephosphat, 3-Dehydroshikimat, Deoxythymidindiphosphat, 5 Deoxythymidinmonophosphat, Deoxythymidintriphosphat, Deoxyuridindiphosphat, Deoxyuridinmonophosphat, Deoxyuridin, Deoxyuridin-triphosphat, Erythrosephosphat, Ethanolamin, Ethanol, Fructosephosphat, Fructosebisphosphat, FAD, Farnesylidiphosphat, 2-(Formamido)-N1-(5'-phosphoribosyl)acetamidin, 5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamid, Fumarylacetoacetat, Formiminotetrahydrofolat, Formylkynurenin, Fosäure, Formiat, Formaldehyd, Formiminoglutama, Fructose, Formyltetrahydrofolat, Formyltetrahydrofolat, Fumarat, Glucosephosphat, Glycerat-2-phosphat, Glycerat-3-phosphat, Galactose, alpha-DGalactose-1-phosphat, D-Glyceraldehyd, Glyceraldehyd-3-phosphat, 5-Phosphoribosylglycinamid, 15 Guanosindiphosphat, GDP-Dehydrodeoxymannose, GDP- Fucose, GDP-Mannose, Geranyldiphosphat, Gluconolactonphosphat, Glyceraldehyd, Glucosamin, Glucosaminphosphat, Glucose, Glutamin, Glycolat, Glycerophosphocholin, Glycerophosphoethanolamin, Gluconat, Phosphogluconat, Glutamat, Glutamatphosphat, Glutamatsemialdehyd, Glutamyl-L-cystein, Glutathion, Glutaryl-CoA, Glycerol, Glycerolphosphat, Glycolaldehyd, Glyceron, Glyoxylat, Glycerat, Guanosinmonophosphat, Guanosintriphosphat, Guanin, Guanosin, Guanidinoacetat, Wasserstoffionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxyanthranilat, Hydroxybutantricarboxyla, Homocitrat, Hydrogencarbonat, Homocystein, Hydroxykynurenin, Hydroxyprolin, Hydroxypyruvat, Histidin, 20 Homoisocitrat, Hydroxymethylglutaryl-CoA, Homogentisat, 3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvat, Sulfid, Homoserin, O-Phosphohomoserin, 2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamindiphosphat, Hypoxanthin, Hydroxybutanoyl-CoA, Hydroxyisobutyryl-CoA, Hydroxyisobutyrat, (2S,3S)-3-Hydroxy- 2-methylbutanoyl-CoA, 4-Hydroxyphenylpyruvat, Isoleucin, 25 4-Imidazolon-5-propanoat, D-erythro-1-(Imidazol-4-yl)glycerol-3-phosphat, Inosinmonophosphat, Indol, Indolglycerolphosphat, Inosin, Isobutyryl-CoA, 30

Isocitrat, Isopropylmalat, Isopentenyldiphosphat, Kaliumion, Kynurenin,  
Lactose, Lactat, Lactaldehyd, Lanosterol, Lathosterol, Leucin,  
Lactoylglutathion, Lipoamid, Linolensäure, Linolsäure, Lysin, Malat,  
Mallonyl-Co, Mannose, Mannosephosphat, Methenyltetrahydrofolat, Methionin,  
5 Methylacetoacetyl-CoA, Methylbutenoyl-CoA, Methyloxopentanoat,  
Methylacrylyl-CoA, Methylthioadenosin, Methylglyoxal, Methylglutaconyl-CoA,  
Methyltetrahydrofolat, Methanethiol, Methylmalonatsemialdehyd,  
Methylentetrahydrofolat, Mevalonat, Phosphomevalonat, Diphosphomevalonat,  
Inositol, Maleylacetoacetat, Mercaptopyruvat, Methyltetrahydro-  
pteroylglutamat, Natriumion, NAD, NADH, Nicotinamidadenin-  
dinucleotidphosphat, Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, Ammoniumion,  
Nicotinat, Nicotinamid, Nicotinamidribonucleotid, Nicotinatribonucleotid,  
Oxaloacetat, Hydroxidion, Oleinsäure, Oleoyl-CoA, Ornithin, Orotat,  
15 Orotidinphosphat, Oxoacid, Methyloxobutanoat, Oxobutanoat, Oxalosuccinat,  
Orthophosphat, Phosphadenylylsulfat, Palmitat, Palmitoyl-CoA, Palmitonat,  
Pantothenat, Pantoat, Pantethein, Phosphoenolpyruvat, Phosphoethanolamin,  
Bisphosphoglycerat, Phenylalanin, Phenylpyruvat, Phosphohydroxypyruvat,  
Pyrophosphat, Phosphopantothenat, Pantetheinphosphat,  
Phosphopantothenoylcystein, Prephenat, Phosphoribosylglycinamid,  
20 Phosphoribosylamin, Prolin, Propanoat, Propanoyl-CoA,  
Phosphoribose-1-diphosphate, Phosphoserin, Presqualendiphosphat,  
Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-N-dimethylethanolamin, Phosphatidyl-  
ethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerophosphat,  
Phosphatidyl-N-methylethanolamin, 1-Phosphatidyl-D-myo-inositol,  
25 Phosphatidylserin, Putrescin, Pyrrolincarboxylat, Pyruvat, Pyridoxalphosphat,  
ppGpp, Quinolinat, 1-(5-Phospho-D-ribosyl)-5-amino-4-imidazolcarboxylat,  
Ribose, Ribosephosphat, Ribulosephosphat, Methyl-3-oxopropanoyl-CoA, Thio-  
schwefelsäureion, Adenosylhomocystein, 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-  
4-(N-succinocarboxamid)-imidazol, Adenosylmethionin, Saccharopin, Sorbitol,  
30 Sedoheptulose-7-phosphat, Serin, Methyl-3-oxopropanoyl-CoA, Sulfition,  
Sulfation, Spermidin, Sphingomyelin, Sphinganin, Sphingosin, Squalen,

Squalenepoxid, Stearat, Stearyl-CoA, Succinat, Succinyl-coA, S-succinyl-dihydrolipoamid, Succinylhomoserin, Succinatsemaldehyd, Thiocystein, Tetrahydrofolat, Tetrahydrobiopterin, Thiamindiphosphat, Threonin, Thymidin, Tetrahydropteroylglutamat, Trehalose, Trehalosephosphat, Triacylglycerol, 5 Tryptophan, Tyrosin, UDP-N-acetyl-D-glucosamin, UDP-N-acetyl-D-galactosamin, Ubiquinol, Ubiquinon, Uridindiphosphat, UDP-Galactose, UDP-Glucose, Uridinmonophosphat, Uracil, Harnstoff, Allophanate, Uridin, Urocanat, Uridintriphosphat, Valin, Xanthin, Xanthosin, Xanthosinphosphat, Xylulosephosphat und Zymosterol.

Demgemäß ist weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, aus einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren mindestens einer biologischen Zelle in einem Kulturmedium,
- 15 b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßem Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) Isolieren des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, aus dem Kulturmedium.

25

Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere

einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

Schritt c) des Verfahrens kann mittels bekannter Aufreinigungsverfahren in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Besonders bevorzugt und, gemäß der vorliegenden Erfindung besonders vorteilhaft, auch zweckmäßig und ausreichend sind einfache mechanische Trennverfahren wie die Filtration, zum Beispiel mit einem einfachen Sterilfilter, bevorzugt mit  $0,2 \mu\text{m}$  Porengröße, oder die Zentrifugation. Zweckmäßigerweise dienen diese Trennverfahren der Abtrennung der im Kulturmedium vorhandenen (intakten) Zellhüllen der thermisch konditionierten Zellen. Im Permeat beziehungsweise im Zentrifugationsüberstand liegen der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, frei von störenden Komponenten vor. Es versteht sich, dass der Fachmann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre, zusätzlich oder an deren Stelle, auch jedes andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßiges Trenn-, Aufreinigungs- oder Isolierungsverfahren wählen kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, in mindestens einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) quantitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, im Kulturmedium.

Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein 5 Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

10 Schritt c) des Verfahrens wird mittels bekannter quantitativer Nachweisverfahren für den interessierenden Metaboliten in an sich bekannter Weise durchgeführt.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich auch ein Verfahren zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, in mindestens einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) qualitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, im Kulturmedium.

25 Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorlie-

genden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

5 Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

Schritt c) des Verfahrens wird mittels bekannter qualitativer Nachweisverfahren für den interessierenden Metaboliten in an sich bekannter Weise durchgeführt.

10 Dir vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Probennahme, insbesondere zur Überführung einer Probe biologischer Zellen aus mikrobiellen, vorzugsweise pilzlichen oder bakteriellen, Kulturen oder Mischkulturen sowie Zellkulturen pflanzlicher, tierischer oder menschlicher Zellen. Diese Zellen können in einem Kultivierungssystem wie Bioreaktor, Schüttelkolben, Proberöhrchen oder Microtiterplatten, insbesondere in einem Kulturgefäß in Form einer 15 Suspensionskultur kultiviert werden. Die Erfindung sieht vor, dass die Probe dem Kultivierungssystem entnommen und in mindestens ein Auffanggefäß überführt wird. Dabei findet erfindungsgemäß bevorzugt die thermische Konditionierung der in der Probe enthaltenen biologischen Zelle(n) statt.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine Zellkonditioniervorrichtung als Bestandteil einer solchen Probennahmeverrichtung. Die erfindungsgemäß Zellkonditioniervorrichtung dient dem thermischen Konditionieren mindestens einer biologischen Zelle, welche vorzugsweise in einem flüssigen Kulturmedium suspendiert ist. Die erfindungsgemäß Zellkonditioniervorrichtung weist mindestens eine an einer Wärmequelle angeordnete und vom flüssigen 25 Kulturmedium durchflossene Kapillare auf, durch die vorzugsweise die im Kulturmedium suspendierte Zellprobe überführt wird. Sie ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare einen Innendurchmesser von 0,5 mm bis 4,5 mm, bevorzugt von 1,0 mm bis 3,0 mm, aufweist und entlang einer tem-

perierten Kapillarstrecke von 50 cm bis 1550 cm, bevorzugt von 90 cm bis 420 cm, der Kapillare mit der Wärmequelle in Kontakt steht.

5 Bevorzugt dient die Zellkonditionierzvorrichtung der Durchführung des vorliegend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens der thermischen Konditionierung. Wie beschrieben, zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere durch die Einhaltung bestimmter Verfahrensparameter aus, die einen überraschenden vorteilhaften technischen Effekt bewirken.

10

Zur Durchführung eines Probennahmeverfahrens mit eingeschlossener thermischer Konditionierung wird Zellsuspension aus dem Kultivierungssystem entnommen und mittels eines ersten Abschnitts der Kapillare, der als kurze Überführungsstrecke ausgelegt ist, und eines daran anschließenden zweiten Abschnitts, der als temperierte Kapillarstrecke ausgeführt ist, in ein Probenahmefäß überführt.

15

Es wurde überraschend gefunden, dass diese Verfahrensparameter mit der erfindungsgemäßen Zellkonditionierzvorrichtung eingehalten werden können, wenn bestimmte geometrische Rahmenbedingungen bei der Dimensionierung der Kapillare der Zellkonditionierzvorrichtung eingehalten werden: Dargestellt sind in Tabelle 1 die Abhängigkeit von Rohrwendellinnendurchmesser und Länge der temperierten Kapillare für extreme Volumenströme 2,5 ml/s bzw. 8 ml/s und extreme Turnoverraten intrazellulärer Metabolite, beispielsweise ATP, von  $\tau = 0,1$  s bzw.  $\tau = 2,7$  s. Die gefundenen Werte lassen sich um beliebige Zwischenwerte für Volumenströme ( $2,5 \text{ ml/s} < \dot{V} < 8 \text{ ml/s}$ ) sowie Turnoverraten ( $0,1 \text{ s} < \tau < 2,7 \text{ s}$ ) erweitern.

Tabelle 1:

Volumenstrom [ml/s]	Turnoverzeit $\tau$ [s]	WE [K s]	Rohrwendellinnendurchmes- ser [cm]	Länge der temperierten Kapillare [cm]
2,5	0,1	70	0,05	83
		300	0,05	1502
	2,7	70	0,2	92
		300	0,2	1511
8	0,1	70	0,11	79
		300	0,11	1498
	2,7	70	0,44	84
		300	0,44	1503

Aufgrund der erfindungsgemäßen Geometrie der Zellkonditionierzvorrichtung beziehungsweise Probennahmeverrichtung kann die optimale Metabolit-Probennahme nur in einem engen Temperaturbereich und einem genau darauf abgestimmten Zeitintervall erfolgen und dadurch die Zellsuspension dermaßen günstig beeinflusst werden, dass der Zellmetabolismus schnell gestoppt und der intrazelluläre Metabolit vollständig freigesetzt wird, die Zellstruktur aber erhalten bleibt. Die Temperatur liegt dabei stets unterhalb des Siedepunkts der Probensuspension.

10

Ein bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Zellkonditionierzvorrichtung, wobei für ein zu übertragendes Wärmeäquivalent von 70 Ks bis 300 Ks zweckmäßigerweise eine Länge der temperierten Kapillarstrecke von etwa 80 cm bis etwa 1510 cm gewählt wird, wobei

5

- a) für einen kleinen Volumenstrom von etwa 2,5 ml/s
  - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 0,5 mm,
  - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 2 mm und
- b) für einen großen Volumenstrom von etwa 8 ml/s
  - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 1 mm, insbesondere 1,1 mm,
  - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 4 mm, insbesondere 4,4 mm

10

beträgt.

Durch eine entsprechende Abwandlung der Geometrie des erfindungsgemäß vorgesehenen Probennahmesystems wird beispielsweise auch eine Metabolomics-Analyse insbesondere in einem HD-screening-Verfahren möglich.

15 Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Zellkonditionierzvorrichtung, welche als Probennahmeverrichtung zur Entnahme einer Probe aus einer Quelle eines die Zelle enthaltenden flüssigen Kulturmediums ausgebildet ist und zusätzlich eine Probenüberführungsstrecke und eine Probensammelvorrichtung aufweist.

20 Der Temperaturverlauf der Zellsuspension in der erfindungsgemäß Vorrichtung ist schematisch in Figur 2 dargestellt. Folgende Größen dienen der Erläuterung der erfindungsgemäß Vorrichtung:

$T_{\text{Wärmequelle}}$  = an der Kapillare angelegte Temperatur der Wärmequelle;  
sie entspricht der Konditioniertemperatur  $T_K$

25  $T_{\text{Suspension}}$  = Temperatur der Suspension im Kultivierungssystem; sie entspricht der Kultivierungstemperatur  $T_M$

T\_Probennahme-

gefäß = Temperatur der Metabolitlösung im Probennahmegeräß

5 s\_tot = Strecke vom Eingang in das integrierte Probennahmesystem bis zum Beginn der durch die Wärmequelle temperierten Kapillarstrecke

10 s\_heiz = Strecke, die für das Aufheizen der Probe vom Eintritt in die durch die Wärmequelle temperierte Kapillare bei T\_Suspension bis zum Erreichen der Temperatur T\_Wärmequelle durchlaufen wird

s\_halte = Strecke, die die Probe mit der Temperatur T\_Wärmequelle in der temperierten Kapillare zurücklegt

s\_Wärmequelle = Länge der durch die Wärmequelle temperierten Kapillarstrecke = Summe von s\_heiz und s\_halte

15 t\_tot = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s\_tot benötigt

t\_heiz = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s\_heiz benötigt

t\_halte = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s\_halte benötigt; sie entspricht der Konditionierzeit  $t_h$

20 t\_Wärmequelle = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s\_Wärmequelle benötigt

Zieht man die Probe bei einer Temperatur der Zellsuspension T\_Suspension, vorzugsweise bei Mikroorganismen und Zellkulturen typischerweise 30-37°C, aus dem Kultivierungssystem, so durchläuft diese als erstes eine Überführungsstrecke s\_tot und wird beim Eintritt in die temperierte Kapillare auf einer kurzen Strecke s\_heiz hinlänglich genau auf die Temperatur der Wärmequelle T\_Wärmequelle gebracht, vorzugsweise +/- 5°C, um im Anschluss durch Vermischung mit bereits vorliegender Probelösung im Probennahmegeräß auf

$T_{\text{Probennahmegeräß}}$  gebracht zu werden, vorzugsweise auf 4°C gekühlt. Die Länge der Aufheizstrecke  $s_{\text{heiz}}$  hängt dabei insbesondere von den Eigenschaften der Zellsuspension, der Geometrie des integrierten Probennahmesystems, der eingestellten Durchflussrate und der angelegten Temperatur

5  $T_{\text{Wärmequelle}}$  durch die Wärmequelle ab. Aufgrund der bevorzugt schnellen Aufheizzeiten wird zur erfindungsgemäßen Übertragung der Wärmeäquivalente die benötigte Zeit der Probe für das Durchlaufen der Aufheizstrecke  $s_{\text{heiz}}$ , nämlich  $t_{\text{heiz}}$ , insbesondere der Haltezeit  $t_{\text{halte}}$  bei einer Temperatur von  $T_{\text{Wärmequelle}}$  zugerechnet. Die Zeit  $t_{\text{halte}}$  bezeichnet die Zeitdauer, die ein infinitesimal kleines Volumenelement mittlerer Strömungsgeschwindigkeit für den Durchlauf der temperierten Kapillarstrecke  $s_{\text{halte}}$  benötigt.

Eine zur Illustration der Erfindung beispielhaft angeführte Zellkonditioniervorrichtung beziehungsweise Probennahmeverrichtung ist in Figur 1 dargestellt. Diese weist eine Quelle (1), insbesondere einen Bioreaktor, auf, worin ein vorzugsweise flüssiges Kulturmedium (2) mit den darin enthaltenen biologischen Zellen eingefüllt ist. Vorzugweise liegen die Zellen in einer Suspensionskultur in dem Bioreaktor vor. Weiter weist die Vorrichtung mindestens eine Kapillare (3) auf, welche an einer Wärmequelle (4) angeordnet ist. Vorzugsweise steht die Wärmequelle über eine bestimmte Heizstrecke in einer den Wärmefluss zwischen Wärmequelle und dem Lumen der Kapillare fördernden Kopplungsweise mit der Kapillare in Verbindung; diese Heizstrecke entspricht der Länge der temperierten Kapillare.

Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer

biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

5 Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung der Zellkonditionierzvorrichtung zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

Da im folgenden die Begrifflichkeiten "Ghosts", "Ghost-Faktor", "Trues", "Trümmer", "Trümmer-Faktor" und Gesamtzellzahl eine wichtige Rolle spielen werden, sollen hier zunächst deren Definition und Bestimmungsmethoden eingeführt werden.

15 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Ghosts“ Zellen verstanden, deren Cytoplasmamembran irreversibel geschädigt wurde, die aber als vollständige „leere“ Zellhüllen vorliegen. Unter „Trues“ werden Zellen verstanden, deren Cytoplasmamembran intakt ist. „Trümmer“ bezeichnet Bruchstücke einer Zelle, deren zelluläre Integrität zerstört wurde; hierbei handelt es sich insbesondere um Lipid-Mizellen, einzelne Proteine und mRNA, nackte beziehungsweise Protein-gebundene DNA-Bruchstücke und vieles andere mehr. Der Begriff „Ghost-Faktor“ bezeichnet ein quantitatives Äquivalent, woraus die Zahl der Ghosts bestimmt wird. Der Begriff „Trümmer-Faktor“ bezeichnet ein quantitatives Äquivalent, woraus die Zahl der Trümmer bestimmt wird.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert, die aber nicht beschränkend zu verstehen sind:

Es zeigen

25 die Figur 1 ein vereinfachtes Schema der erfindungsgemäßen Vorrichtung,  
die Figur 2 ein schematisches Temperaturprofil in der erfindungsgemäßen Vorrichtung,  
die Figur 3 den Grad der Metabolit-Freisetzung aus den Mikroorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von der angeleg-

ten Temperatur der Wärmequelle =  $T_K$ . Erst bei einer Konditionier-temperatur  $T_K$  über 60°C findet eine signifikante Freisetzung von Metaboliten statt. Bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von ca. 95°C wird eine vollständige Freisetzung erreicht. Die Konditionier-zeit  $t_h$  betrug 1,2 s,

5

die Figur 4 den Grad der Metabolit-Freisetzung bei *E. coli* in Abhängigkeit von der Zeit  $t_{\text{halte}}$ . In Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur  $T_K$  werden verschiedene lange Konditionierzeiten  $t_h$  für eine vollständige Metabolitfreisetzung benötigt. Dabei muss eine Schwellentemperatur  $T_{\text{krit, Metabolit}}$  überschritten sein,

10

die Figur 5 die Entstehung von Ghosts bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 95°C in Abhängigkeit von der Konditionierzeit  $T_h$  bei einer *E. coli*-Kultur,

15

die Figur 6 die Entstehung von Zelltrümmern durch die erfindungsgemäße Vorrichtung bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 95°C in Abhängigkeit von der Konditionierzeit  $t_h$  bei *E. coli*,

20

die Figur 7 die Entstehung von Ghosts in Abhängigkeit von der Konditionier-temperatur  $T_K$  bei einer Konditionierzeit  $T_h$  von 1,2 s bei einer Probenahme aus einer *E. coli*-Kultur mittels der erfindungsge-mäßen Vorrichtung,

die Figur 8 den überraschenden Zusammenhang zwischen Trümmer-Bildung, Ghost-Bildung, Metabolit-Freisetzung und GZZ in Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur  $T_K$ ,

25

die Figur 9 die Abhängigkeit der Bildung von Ghosts von den angelegten Wärmeäquivalenten. Nur in einem sehr engen Bereich von 70 bis 300 Ks WE erfolgt bei *E. coli* eine sehr befriedigende Bildung ei-

ner vorteilhaft hohen Zahl von Ghosts, das Optimum liegt dabei bei 110 Ks,

5

die Figur 10 das Ergebnis der Analyse der erfindungsgemäß bei der Proben-  
nahme und –Überführung freigesetzten Metabolite ausgewählter  
Stoffklassen (Legende: PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP =  
Summe von Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-  
phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, 2PG/3PG = Summe aus  
2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat, FBP = Fructose-  
bisphosphat).

10

#### Beispiel 1: Freisetzung von Metaboliten

15

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, in Form eines integrierten Probennahmesystems intrazelluläre Metabolite freizusetzen, wurde exemplarisch am Beispiel der Freisetzung von ATP verfolgt. Die ATP-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines enzymatischen Biolumineszenz-Verfahrens ermittelt (Tran & Unden Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation Eur. J. Biochem. (1998) 251:538-43). ATP liegt vermutlich aufgrund lysierter Zellen im Medium von Zellsuspensionen wie die meisten Metabolite in der Regel nur in minimalen Mengen vor. Aufgrund seiner ionischen Phosphatgruppen kann ATP nur in äußerst vernachlässigbarer Menge über die Cytoplasmamembran diffundieren. Die Metabolitfreisetzungversuche wurden mit *E. coli*-Kulturen als charakteristische Vertreter gram-negativer prokaryotischer Zellsuspensionen, mit *B. subtilis*-Kulturen als charakteristische Vertreter gram-positiver prokaryotischer Zellsuspensionen, und mit *S. cerevisiae*-Kulturen als charakteristische Vertreter eukaryotischer Zellsuspensionen durchgeführt. Eine vollständige Metabolit-Freisetzung sei im folgenden definiert als Nachweis von mehr als >95% der ATP-Menge, die bei einem schnellen Abstoppen der Zellsuspension mit kochendem Wasser für 2 Minuten und anschließendem Ultra-

25

schall-Aufschluss (30s, Ultraschallgerät, Bandelin electronic, Typ UW 2200, 12207 Berlin, Deutschland) nachgewiesen werden kann.

### 1.1 Freisetzung von Metaboliten: Abhängigkeit von der Konditionierzeit $t_h$

Bei einer gegebenen Temperatur  $T_{\text{Wärmequelle}}$ , die der Konditioniertemperatur  $T_K$  entspricht, spielt die Haltezeit  $t_{\text{halte}}$ , die der Konditionierzeit  $t_h$  entspricht, eine wichtige Rolle für den Grad der Metabolit-Freisetzung. Um den Einfluss der Konditionierzeit  $t_h$  bei der Metabolit-Freisetzung zu untersuchen, wurde für *E. coli* bei verschiedenen Temperaturen (30°C, 60°C und 95°C) die Konditionierzeit  $t_h$  variiert. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt. Bei Konditioniertemperatur  $T_K = 95^\circ\text{C}$  wird eine vollständige Metabolit-Freisetzung bereits bei Konditionierzeiten  $t_h$  wesentlich unter einer Minute erreicht. Bei Konditioniertemperatur  $T_K = 60^\circ\text{C}$  wird im Rahmen der Versuchszeit erst bei Konditionierzeit  $t_h = 5 \text{ min.}$  eine vollständige Metabolitfreisetzung erreicht. Bei tieferen Temperaturen wird keine vollständige Metabolit-Freisetzung innerhalb eines akzeptablen Zeitraumes (<5 min.) mehr erreicht, bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 37°C wird sogar überhaupt kein Anstieg der Metabolit-Freisetzung mehr beobachtet. Die durch die Wärmequelle angelegte Konditioniertemperatur  $T_K$  muss also eine Schwellentemperatur  $T_{\text{krit,min}}$  übersteigen, damit im Rahmen einer vernünftigen Zeitspanne der Konditionierzeit  $t_h$  von vorzugsweise weniger als 5 min. eine vollständige Freisetzung der intrazellulären Metabolite erreicht werden kann.

### 1.2 Freisetzung von Metaboliten: Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur $T_K$

Die Abhängigkeit des Grades der Metabolit-Freisetzung von der Konditioniertemperatur  $T_K$  bei einer gegebenen Konditionierzeit  $t_h$  von 1,2 s wurden mit *E. coli*, *B. subtilis*- und *S. cerevisiae*-Kulturen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in

Figur 3 dargestellt. Während bis zu einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 60°C keine signifikante Freisetzung von Metaboliten beobachtet werden kann, steigt der Freisetzungsgrad bei höheren Konditioniertemperaturen signifikant an und erreicht bei allen drei Zellsystemen bei spätestens 95°C eine vollständige Freisetzung der Metabolite. B. subtilis als gram-positiver Organismus zeigt gegenüber S. cerevisiae und E. coli erst bei höheren Temperaturen vergleichbare Anteile freigesetzter Metabolite.

#### Beispiel 2: Bewahrung der strukturellen Integrität

Für die Bewahrung der strukturellen Integrität von Zellen wurden im Hinblick auf das integrierte Probennahmesystem zwei entscheidende Einflussgrößen, vergleichbar mit der Metabolit-Freisetzung, identifiziert: Die Konditionierzeit  $t_h$ , die bei der vorzugsweise eingesetzten erfindungsgemäßen Vorrichtung der  $t_h$  halte entspricht, und die angelegte Konditioniertemperatur  $T_K$ , die bei der vorzugsweise eingesetzten erfindungsgemäßen Vorrichtung der Temperatur  $T$  Wärmequelle der mit der Kapillare verbundenen Wärmequelle entspricht.

Der Nachweis der „Ghosts“ erfolgt zweckmäßigerweise über den Farbstoff Propidiumiodid, der aufgrund seiner positiven Ladung nur durch geschädigte Membranen permeieren kann. Propidiumiodid interkaliert in die DNA und fluoresziert daraufhin rot, weshalb auch Ghost-Zellen rot fluoreszieren. Quantitativ wurden Ghosts in der vorliegenden Patentschrift mit Hilfe des Ghost-Faktor nachgewiesen.

Der quantitative Nachweis von Ghosts erfolgt über den Ghost-Faktor. Dieser ergibt sich anhand der Formel:

$$\text{Ghost-Faktor} = ((\text{rot}_P - \text{rot}_{\text{Ü}_P}) - (\text{rot}_{\text{Ref}} - \text{rot}_{\text{Ü}_{\text{Ref}}})) / (\text{grün}_{\text{Ref}} - \text{grün}_{\text{Ü}_{\text{Ref}}})$$

Hierbei ist:

$\text{rot}_P$  = Rot-Fluoreszenz der behandelten Probensuspension

prozessiert bzw. durch alternative Methoden und Verfahren konditioniert worden waren (behandelt).

Der Nachweis der „Trues“ erfolgt über den Farbstoff SYTO® 9. Dieser ist ungeladen und kann somit sowohl durch intakte als auch durch beschädigte Membranen in die DNA interkalieren. Daher markiert er, wenn er alleine verwendet wird, alle Zellen, sowohl die mit intakter (Trues) als auch die mit beschädigter (Ghosts) Membran. In Kombination mit Propidiumiodid eingesetzt (wie hier der Fall) wird SYTO® 9 durch Propidiumiodid reduziert und verdrängt. Daher fluoreszieren nur Zellen mit intakten Membranen (Trues) grün.

10

Der quantitative Nachweis von Trümmern erfolgt über den Trümmer-Faktor. Dieser ergibt sich anhand der Formel:

$$\text{Trümmer-Faktor} = (\text{rot\_Ü\_P} - \text{rot\_Ü\_Ref}) / (\text{rot\_P} - \text{rot\_Ref}) * (\text{rot\_P} - \text{rot\_Ref}) / (\text{grün\_Ref} - \text{grün\_Ü\_Ref})$$

Hierbei ist:

15       $\text{rot\_Ü\_P}$       = Rot-Fluoreszenz der behandelten, abzentrifugierten Zellsuspension

       $\text{rot\_Ü\_Ref}$       = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Zellsuspension

20       $\text{rot\_P}$       = Rot-Fluoreszenz der behandelten Zellsuspension

20       $\text{rot\_Ref}$       = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten Zellsuspension

20       $\text{grün\_Ref}$       = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten Probensuspension

20       $\text{grün\_Ü\_Ref}$       = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Probensuspension

25      Die Durchführung der Messung des Trümmer-Faktors entspricht der Vorgehensweise bei der Bestimmung des Ghost-Faktors. Der Trümmer-Faktor misst dabei hauptsächlich nackte DNA-Bruchstücke.

Die Gesamzellzahl (GZZ) wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, improved) unter dem Lichtmikroskop bestimmt und entspricht der Summe aus Trues und Ghosts.

2.1 Bewahrung der strukturellen Integrität: Abhängigkeit von der Konditionierzeit  $t_h$

5

Um die Abhängigkeit der strukturellen Integrität von der Konditionierzeit  $t_h$  zu untersuchen, wurden bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 95°C verschiedene Konditionierzeiten  $t_h$  angelegt. Die Ergebnisse sind in Figur 5 dargestellt.

10 Definitionsgemäß ergibt der Ghost-Faktor bei der unbehandelten Zellsuspension einen Wert von 0. Dieser steigt bei einer Konditionierzeit  $t_h$  von 1,2 s überraschenderweise sprunghaft auf 1,01 an. Er sinkt wiederum ab Konditionierzeiten  $t_h$  ab 5 s schnell auf 0,56, um im weiteren Verlauf mit längerer Zeitdauer weiter stetig abzusinken, wie in Figur 5 dargestellt ist. Es kann daher geschlossen werden, dass nur eine überraschend kurze Konditionierzeit  $t_h$  für die Beibehaltung der zellulären Integrität der Zellen angelegt werden muss; bei längerer Zeiteinwirkung und Temperaturen  $T_K$  über  $T_{krit,min}$  geht die zelluläre Integrität jedoch unerwünschterweise verloren.

15

20 Im Gegensatz zu anderen Zellaufschlussmethoden zur Metabolit-Freisetzung, wie beispielsweise der Rührwerkskugelmühle oder dem Ultraschall, entstehen bei dem integrierten Probennahmesystem in wesentlich geringerem Ausmaß Zelltrümmer; die gefundenen Messwerte sind in Tabelle 2 dargestellt. Diese entstehen in Abhängigkeit von der angelegten Temperatur  $T_{Wärmequelle}$  über  $T_{krit,min}$  und nehmen mit der Zeit zu, siehe Figur 6.

25

Tabelle 2 zeigt den Trümmer-Faktor bei Probennahme und Metabolit-Freisetzung nach Behandlung der Zellsuspension mittels des integrierten Probennahmesystems, mittels Rührwerkskugelmühle und mittels Ultraschall-Aufschluss. Rührwerkskugelmühle und Ultraschall-Aufschluss zerstören die

Zellintegrität und erzeugen eine wesentlich höhere Menge an Zelltrümmern als das erfindungsgemäße Verfahren.

Tabelle 2:

Thermische Konditionierung (erfindungsgemäß)		Trümmer-Faktor
Konditioniertemperatur $T_K$ [°C]	Konditionierzeit $t_h$ [s]	
95	1,2	0,00
95	20	0,05
95	45	0,04
Rührwerkskugelmühle für 11 min. (Vergleich)		0,72
Ultraschallaufschluss für 30 s (Vergleich)		0,99

5 2.2. Bewahrung der strukturellen Integrität: Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur  $T_K$

Um die Abhängigkeit der strukturellen Integrität von der Temperatur zu untersuchen, wurden die Folgen von Temperatur-Variationen auf die Entstehung von Ghosts analysiert. Ghosts sind Zellen, deren Metabolite freigesetzt wurden, die ihre strukturelle Integrität jedoch beibehalten haben.

Die Ergebnisse bei einer Konditionierzeit  $t_h$  von 1,2 s sind in Figur 7 dargestellt. Während bis zu Konditioniertemperaturen  $T_K$  von 75°C nur ein schwacher Anstieg von Ghosts, gemessen am Ghost-Faktor, erfolgt, steigt dieser bei höheren Konditioniertemperaturen sprunghaft an und erreicht bei einer Konditionier-temperatur  $T_K$  von etwa 85°C ein Maximum. Bei Konditioniertemperaturen von 90°C und 95°C ist eine geringe Abnahme des Ghost-Faktors zu beobachten, siehe Figur 7. Im Vergleich zu bekannten Metabolit-Freisetzungsvorfahren (Kugelmühle, Ultraschall) erzeugt die Freisetzung von Metaboliten mittels des er-

findungsgemäßen Verfahrens vorteilhafterweise wesentlich mehr Ghosts als die bekannten Verfahren; dies ist in Tabelle 3 dargestellt.

5

Tabelle 3 zeigt den Ghost-Faktor bei Probennahme und Metabolit-Freisetzung nach Behandlung der Zellsuspension mittels des integrierten Probennahmesystems, mittels Rührwerkskugelmühle und mittels Ultraschall-Aufschluss. Rührwerkskugelmühle und Ultraschall-Aufschluss zerstören die Zellintegrität und erzeugen eine wesentlich höhere Menge an Zelltrümmern als das integrierte Probennahmesystem. Dagegen erzeugt das erfindungsgemäße Verfahren eine wesentlich größere Menge an Ghost als die Behandlung der Zellsuspension mittels Rührwerkskugelmühle oder Ultraschall.

Tabelle 3:

Thermische Konditionierung (erfindungsgemäß)		Ghost-Faktor
Konditioniertemperatur $T_k$ [°C]	Konditionierzeit $t_h$ [s]	
95	1,2	1,01
95	20	0,57
95	45	0,41
Rührwerkskugelmühle für 11 min. (Vergleich)		-0,05
Ultraschallaufschluss für 30 s (Vergleich)		-0,12

15

Ein zugrunde liegendes Modell erfordert, dass die Gesamtzellzahl GZZ die Summe aus Trues und Ghosts darstellt, dass sobald keine Trues mehr vorliegen, die Metabolitfreisetzung vollständig sein sollte, dass mit Abnahme der Ghosts die Zahl der Trümmer zunehmen sollte und dass es eine maximale Temperaturgrenze gibt, ab der vermehrt Zelltrümmer und keine Ghosts gebildet werden.

5 Diese Zusammenhänge wurden experimentell an *E. coli* für Kultivierungstemperaturen  $T_K$  im Bereich von 50°C bis 121°C untersucht. Bei Konditioniertemperaturen über 100°C mussten hierfür andere, das heißt erweiterte, Probenahmeverrichtungen als das erfindungsgemäß bevorzugte eingesetzt werden; um mittels eines angelegten Überdruckes wurde ein Sieden der Probensuspension stets vermieden. Die Konditionierzeit  $t_h$  wurde zwischen 1,2 s und 600 s variiert.

10 In Figur 8 sind die experimentellen Ergebnisse in der Zusammenschau dargestellt. Eine vollständige Metabolit-Freisetzung erfolgt, wenn alle Trues in Ghosts oder Trümmer umgewandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass überraschenderweise bei bestimmten Konditioniertemperaturen  $T_K$  kritische Schwellenwerte erreicht werden. Der Verlauf des Ghost-Faktors, der ein Maß für die Zahl der gebildeten Ghosts ist, zeigt überraschenderweise ein Optimum bei einem Intervall von  $T_K$  von 65°C bis 105°C, insbesondere von 80°C bis 95°C.

15 Beispiel 3: Kombinatorisches Optimum: Wärmeäquivalente

20 Wie vorstehend dargestellt, resultiert der Einsatz von Ultraschall oder Rührwerkskugelmühle für die Metabolit-Freisetzung in einem nicht-selektiven Zellaufschluss mit einem hohen Anteil an Trümmern, siehe Tabellen 2 und 3. Durch das erfindungsgemäß Verfahren kann dagegen der Anteil von Trümmern signifikant reduziert, der Anteil von Ghosts bei gleichzeitiger Freisetzung von Metaboliten optimiert werden (Tabelle 3). Aus den vorstehend beschriebenen Untersuchungen ergibt sich, dass die Parameterkombination von Konditionierzeit  $t_h$  und Konditioniertemperatur  $T_K$  eine große Bedeutung für den Grad der Metabolit-Freisetzung und die Bewahrung der strukturellen Integrität der Zellen hat. Aus den Untersuchungen lässt sich bevorzugt folgendes einfache multifaktorielle Modell ableiten:

5 (1) Konditioniertemperatur  $T_K < T_{krit,min}$

Unterschreitet die angelegte Konditioniertemperatur  $T_K$  eine kritische Temperatur  $T_{krit,min}$ , so erfolgt aufgrund der Wärmebehandlung nur eine sehr langsame Freisetzung von Metaboliten und nur eine sehr langsame Bildung von Ghosts, wie durch einen tiefen Ghost-Faktor angezeigt.

10 (2)  $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$   
und Konditionierzeit  $t_h < t_{krit,min}$

In diesem Fall erfolgt die Bildung von Ghosts und damit korrelierend die Freisetzung von Metaboliten. Da jedoch die Konditionierzeit die minimale kritische Haltezeit  $t_{krit,min}$  nicht übersteigt, ist die Bildung von Ghosts nicht maximal, es erfolgt keine vollständige Metabolit-Freisetzung.

15 (3)  $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$   
und  $t_{krit,min} < \text{Konditionierzeit } t_h < t_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt eine optimale Bildung von Ghosts bei vollständiger Metabolit-Freisetzung.

20 (4)  $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$   
und Konditionierzeit  $t_h > t_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt zwar eine vollständige Metabolit-Freisetzung, da jedoch die Konditionierzeit die maximale kritische Haltezeit  $t_{krit,max}$  übersteigt, wird die strukturelle Integrität der Zellen beschädigt und aus den Ghosts entstehen signifikant Trümmer.

25 (5)  $\text{Konditioniertemperatur } T_K > T_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt ebenfalls eine vollständige Metabolit-Freisetzung, da jedoch die angelegte Konditioniertemperatur die kritische maximale Temperatur  $T_{krit,max}$  übersteigt, entstehen nur wenige Ghosts. Die Probensuspension ist daher nur sehr schlecht aufzuarbeiten.

Für die kritische minimale und maximale angelegte Temperatur in der durch die Wärmequelle temperierten Kapillare  $T_{krit,min}$  und  $T_{krit,max}$  konnten in Abhängigkeit von den eingesetzten Zellsystemen die in Tabelle 4 dargestellten Werte ermittelt werden.

5 Tabelle 4 zeigt kritische minimale und maximale angelegte Temperaturen  $T_{krit,min}$  und  $T_{krit,max}$  für verschiedene Zellsysteme: *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae*.

Tabelle 4:

Beispielsystem	$T_{krit,min}$	$T_{krit,max}$
<i>E. coli</i>	70°C	Siedepunkt der Probenlösung (105°C)
<i>B. subtilis</i>	75°C	Siedepunkt der Probenlösung (105°C)
<i>S. cerevisiae</i>	70°C	Siedepunkt der Probenlösung (105°C)

10 Die kritischen minimalen und maximalen Haltezeiten  $t_{krit,min}$  und  $t_{krit,max}$  sind keine Konstanten, sondern hängen insbesondere von der angelegten Konditioniertemperatur ab. Um eine optimale Kombination der Parameter Konditionierzeit  $t_h$  und Konditioniertemperatur  $T_K$  für eine zweckmäßige Dimensionierung der erfundungsgemäß Vorrichtung zu erreichen, wurden beide Größen über eine Multiplikation kombiniert, das Ergebnis des Produktes als Wärmeäquivalente (WE) mit der Einheit "K·s" bezeichnet. Vor der Multiplikation wurde von der angelegten Konditioniertemperatur  $T_K$  [ $^{\circ}$ K] die Kultivierungs-temperatur  $T_M$  des Organismus [ $^{\circ}$ K] subtrahiert.

15

20 Zum Beispiel liegt die Kultivierungstemperatur  $T_M$  bei *E. coli* vorzugsweise bei ca. 310°K; dies entspricht ca. 37°C. Das Optimum an WE konnte so für *E. coli* bei  $110 \pm 20$  K·s ermittelt werden (Tabelle 5).

Für weitere biologische Systeme sind repräsentativ in Tabelle 5 weitere gefundene Optima (WE<sub>opt</sub>) angegeben.

Tabelle 5:

Beispielsystem für		WE_min	WE_opt	WE_max
E. coli	gram-negative Prokaryonten	70	110	300
B. subtilis	gram-positive Prokaryonten	90	130	300
S. cerevisiae	Eukaryonten	70	110	260

Beispiel 4: Geometrie des integrierten Probennahmesystems

5 Aus dem Wissen um die Abhängigkeit von der Größe „Wärmeäquivalent“ als eine Funktion der Konditionierzeit  $t_h$ , Konditioniertemperatur  $T_K$  und Kultivierungstemperatur  $T_M$  ergeben sich für die geometrische Auslegung zwingende geometrische Randbedingungen und Kriterien, deren Einhaltung für die (i.) ausreichend schnelle quantitative Metabolitfreisetzung (Schritte „Transfer“ durch das Totvolumen sowie „Quenching“), wobei die Zeitkonstanten der biochemischen Reaktionen (turnover) zu berücksichtigen sind, und (ii.) der Erziehung von Zellen der gewünschten Struktur, das heißt insbesondere „Ghost-Zellen“, durch die Wahl charakteristischer Konditionierzeiten unbedingt erforderlich ist. Eine weitere Randbedingung ergibt sich (iii.) aus den Anforderungen 10 der subsequenten Analyse der Proben bezüglich des minimalen Probennahmenvolumens (Volumenstrom).

15

Die geometrische Auslegung muss gewährleisten, dass die ermittelte kritische Temperatur  $T_{krit,min} < T_{krit} < T_{krit,max}$  (Schritt „Quenching“) innerhalb der Heizzeit  $t_{heiz}$  auf dem Streckenabschnitt  $s_{heiz}$  erreicht wird. Hierbei ist die

für das Quenching des Metabolismus erforderliche Zeitkonstanten  $t_{heiz}$  maßgebend.

Ausgehend von einer Bilanz der Wärmeströme lassen sich geometrische Beziehungen ableiten:

5

$$\rho \cdot \dot{V} \cdot c_p \cdot (T_{Suspension} - T_{WT}) = -Nu \cdot \lambda \cdot \pi \cdot s_{heiz} \cdot \frac{(T_{WT} - T_{Suspension}) - (T_{WT} - (T_{WT} - 5K))}{\ln \frac{(T_{WT} - T_{Suspension})}{(T_{WT} - (T_{WT} - 5K))}} \quad (Gl.1)$$

$T_{WT}$  ist in unserem System gleichzusetzen mit  $T_{Wärmequelle}$ . Unter Verwendung einer geeigneten Kriteriengleichung der Form  $Nu = c \times Re \times Pr$  für die Nusselt-Zahl (VDI-Wärmeatlas) folgt (Gl.2):

$$\rho \cdot \dot{V} \cdot c_p \cdot (T_{Suspension} - T_{Wärmequiv}) = -(3.953 + 0.0864 [1 + 0.8 \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{0.9}]) \cdot \left( \frac{4 \cdot \dot{V}}{\pi \cdot d \cdot \nu} \right)^{0.652} \cdot 3.4 \cdot \lambda \cdot \pi \cdot s_{heiz} \cdot 58K$$

10

Im Folgenden sind Stoffdaten (auf der Basis von Wasser, temperaturgemittelt), dimensionslose Kenngrößen  $Re$  und  $Pr$  zur Berechnung von Fluidodynamik und Wärmeübergang sowie geometrische Größen ( $d$ ,  $D$ ) des verwendeten Probennahmesystems aufgelistet:

Re	4900
$Re = 0,5 \cdot [Re(35^\circ C) + Re(90^\circ C)]$	
Pr	3,4
$Pr = 0,5 \cdot [Pr(35^\circ C) + Pr(90^\circ C)]$	
c/m/n, mit $m = m(d, D)$	0,083/0,652/0,333
d	2,03 mm
D	57 mm
w	1,08 m/s
$\Delta T_m$	58 K

Q

761 W

5

Mit den auf der Basis von Wasser temperaturgemittelten Stoffwerten ( $\rho = 0.979$  mg/l,  $cp = 4,192$  kJ/(kg K),  $v = 0,525 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s,  $\lambda = 0,652$  W/(m K) sowie als technischen Randbedingungen eine mindestens erforderliche Probennahmefrequenz von  $f = 5$  s<sup>-1</sup> (entsprechender Volumenstrom von mindestens 2,5 ml/s) und ein Windungsdurchmesser der Rohrwendel von 0,057m (siehe Tabelle 6 für Stoffdaten, dimensionslose Kennzahlen zur Berechnung von Fluidodynamik und Wärmeübergang sowie den geometrischen Größen d, D) folgt für die geometrische Auslegung zunächst folgende Gleichung (Gl.3):

$$S_{hertz} = \frac{1}{0.618 + 0.02 \cdot [1 + 0.8 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.9}] \cdot \left(\frac{6.06}{d}\right)^{0.5+0.2903 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.194}}}$$

10

Die Anzahl der zu übertragenden Wärmeäquivalente durch das integrierte Probennahmesystem ist eine Funktion der verwendeten Organismen, d.h. der spezifischen intrazellulären Metabolit-Poolkonzentrationen, und hat durch eine geeignete Dimensionierung derart zu erfolgen, dass in der für den Vorgang Transport durch das Totvolumen und den Vorgang Quenching benötigten Zeit maximal 10% dieser Poolkonzentration auf der Probennahmestrecke umgesetzt werden kann. Ein Verlust von 10% der Poolkonzentrationen kann im Hinblick auf quantitative Analysen gerade noch akzeptiert werden. Wegen des hohen turnover wurde für die Berechnungen der ATP-turnover herangezogen. Intrazelluläre ATP-Konzentrationen, spezifischen ATP-Bildungsraten und turnover  $\tau$  für die betrachteten Organismen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

20

Die Tabelle 6 zeigt Intrazelluläre ATP-Konzentrationen, spezifischen ATP-Bildungsraten und turnover  $\tau$  für verschiedene Zellsysteme. Das Zellsystem E. coli repräsentiert gram-negative Prokaryonten, B. subtilis gram-positive Prokaryonten, S. cerevisiae einzellige eukaryotische Systeme. Extremwerte sind  $\tau_{ATP} = 0,1$  s und  $\tau_{ATP} = 3$  s.

25

Tabelle 6:

Verdünnungsrate $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$			
Zellsystem	cATP [ $\mu\text{mol/gTS}$ ]	qATP [mmol/(gTS h)]	$\tau\text{ATP}$ [s]
E. coli	0,7-7,6	13-25	0,1-2,1
B. subtilis	1,8	15,5	0,4
S. cerevisiae	0,4-8,0	10,8	0,1-2,7

Verdünnungsrate $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$			
Zellsystem	cATP [ $\mu\text{mol/gTS}$ ]	qATP [mmol/(gTS h)]	$\tau\text{ATP}$ [s]
E. coli	8,7	60,5	0,5
B. subtilis	1,8	55,2	0,1
S. cerevisiae	0,4-8,0	69,8	ca. 0,4

Dann gilt (Gl.4):

$$d = \left( \frac{4 \cdot \dot{V} \cdot 0,1 \cdot c_{\text{ATP}}}{q_{\text{turnover}}(\text{ATP}) \cdot \pi \cdot s_{\text{heiz}}} \right)^{0,5}$$

5 Die Lösung der Wärmebilanz gemäß Gl.1 lieferte die für die Übertragung der Wärmeäquivalente erforderliche Heizstrecke  $s_{\text{heiz}}$  des Vorgangs Quenching. Diese ist eine Funktion des Rohrwendel-Innendurchmessers nach Gl.3 und Gl.4.

Ist die kritische Temperatur  $T_{krit,min} < T_{krit} < T_{krit,max}$  erreicht, müssen auf der Probennahmestrecke  $s_{halte}$  die Wärmeäquivalente übertragen werden (Figur 9). Die von der Geometrie abhängige Zeit  $t_{halte}$  ergibt sich zu (Gl.5):

$$t_{halte} = \frac{WE_{opt}}{T_{Wärmequelle} - T_{Suspension}} - \frac{\pi \cdot d^2}{V \left( 2.472 + 0.08 \cdot [1 + 0.8 \cdot \left( \frac{d}{0.057} \right)^{0.9}] \cdot \left( \frac{6.06}{d} \right)^{0.5+0.2903 \cdot \left( \frac{d}{0.057} \right)^{0.194}} \right)}$$

5

Für die Haltestrecke  $s_{halte}$  gilt (Gl. 6):

$$s_{halte} = t_{halte} \cdot w$$

und damit für die gesamte temperierte Strecke  $s_{Wärmequelle}$  (Gl. 7):

$$s_{Wärmequelle} = s_{halte} + s_{heiz}$$

10 Eine bevorzugte apparative Umsetzung ist insbesondere in Form einer Rohrwendel mit den charakteristischen geometrischen Abmessungen wie nachstehend dargestellt, erfüllbar:

Rohrwendel-  $d_i = 2.8 \text{ mm} - 2.2/ +1.7 \text{ mm}$

Innendurchmesser:

Heizstrecke:  $s_{heiz} = 16 \text{ cm} \pm 6 \text{ cm}$

Geometriekennzahl:  $d_i/s_{heiz} = 0.0175 \pm 0.0135$

temperierte Kapillarstrecke:  $s_{Wärmequelle} = 240 \text{ cm} - 160/ +1271 \text{ cm}$

15 Die Abweichungen der einzelnen geometrischen Größen vom angegebenen optimalen Wert können sich je nach Zellsystem und Kultivierungsbedingungen, spezifischen Turnoverzeiten (vgl. Tabelle 6) sowie je nach Volumenstrom, der bevorzugt zwischen 2,5 und 8 ml/s eingestellt wird, ergeben. Bei kleinen Innendurchmessern von  $d_i < 1,2 \text{ mm}$  ist bei Verwendung von Gl. 3 der Windungs-

durchmesser der Rohrwendel vorzugsweise zu verkleinern (lt. VDI-Wärmeatlas).

Symbolverzeichnis:

Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\dot{V}$	Volumenstrom durch integrierte Probennahme	$\text{m}^3/\text{s}$
$f$	Probennahmefrequenz	$\text{s}^{-1}$
$\tau$	turnover	$\text{s}$
$\rho$	Dichte	$\text{kg}/\text{m}^3$
$w$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit	$\text{m}/\text{s}$
$d_i$	Rohrwendel-Innendurchmesser	$\text{m}$
$D$	Windungsdurchmesser	$\text{m}$
$\Delta T_m$	mittlere logarithmische Temperaturdifferenz	K
Re	Reynolds-Zahl	
Pr	Prandtl-Zahl	
Nu	Nusselt-Zahl	
$c, m, n$	Koeffizienten bzw. Exponenten	
$c_p$	spezifische Wärmekapazität	$\text{kJ}/(\text{kg K})$
$\nu$	kinematische Zähigkeit	$\text{m}^2/\text{s}$
$\eta$	dynamischen Zähigkeit	$\text{kg}/(\text{m s})$
$\lambda$	Wärmeleitzahl	$\text{W}/(\text{m K})$

#### Beispiel 5: Gewinnung und Analyse intrazellulärer Metabolite

5 Der E.coli-Stamm K-12 wurde steril in einem Bioreaktor (KLF 2000, Bioengineering, Wald, Schweiz) bei einer Kultivierungstemperatur  $T_M$  (entspricht  $T_{\text{suspension}}$ ) von 37°C, entsprechend 310°K, kultiviert. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung einer integrierten Probennahme, die mit folgenden Parametern betrieben wurde, wurden Proben konditioniert:

Volumenstrom	3,5 ml/s
Kapillarinndurchmesser, $d_i$	2,03 mm
Länge der temperierten Kapillarstrecke, $s_{Wärmequelle}$	205 cm
Konditioniertemperatur $T_K$ ,	95°C
$T_{Wärmequelle}$	

Bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  von 95°C und einer Konditionierzeit  $t_h$  von 1,9 s wurde erfindungsgemäß ein Wärmeäquivalent WE von 110 Ks übertragen.

Ergebnis I:

5 Die Zellsuspension konnte während der Probennahme simultan gequencht und selektiv aufgeschlossen werden.

Die Analyse der aus den konditionierten Zellen freigesetzten Metabolite erfolgte mittels Ionenchromatographie (Dionex DX500) und LC-MS (Thermo Quest Finnigan AQA) nach einem einfachen Filtrationsschritt mit einem Porendurchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$ ), worin die Zellhüllen (Ghosts) und eventuell noch vorhandene intakte Zellen (Reals), zurückgehalten wurden.

10 Durch wiederholte erfindungsgemäße Probennahme wurde der zeitliche Verlauf ausgewählter intrazellulärer Metabolitkonzentrationen einer steady-state E. coli-Kultur bei  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$  mit der Biomassekonzentration im Bioreaktor von  $c=2,30$  g/l (in g Trockengewicht) beobachtet, nachdem zum Zeitpunkt  $t=0$  s ein extrazellulären Puls von 0,3 g/l Glucose in den Bioreaktor gegeben wurde. Gemesen wurden beispielhaft PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP = Summe von Dihydroxyacetophosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, 2PG/3PG = Summe aus 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat sowie FBP = Fructosebisphosphat.

Ergebnis II:

Die Figur 10 zeigt das Ergebnis der Analyse der erfundungsgemäß bei der Pro-  
bennahme und –überführung freigesetzten Metabolite ausgewählter Stoffklas-  
sen. Legende: PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP = Summe von Dihydro-  
5 xyacetophosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, ADP = Adenosin-  
diphosphat, 2PG/3PG = Summe aus 2-Phosphoglycerat und 3-  
Phosphoglycerat, FBP = Fructosebisphosphat.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, wobei die Zelle bei einer Kultivierungstemperatur  $T_M$  in einem Kulturmedium kultiviert wird und anschließend für eine Konditionierzeit  $t_h$  bei einer Konditioniertemperatur  $T_K$  konditioniert wird,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass das Wärmeäquivalent  $WE$ , gemäß der Formel
$$WE = t_h \cdot (T_K - T_M)$$
von 70 K· s bis 300 K· s beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditioniertemperatur  $T_K$  von  
10 65°C bis 105°C, bevorzugt von 80°C bis 95°C, beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditioniertemperatur  $T_K$  stets unter dem Siedepunkt des Kulturmediums liegt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditionierzeit  $t_h$  von 0,5 s bis 600 s, bevorzugt von 1 s bis 180 s, beträgt.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kultivierungstemperatur  $T_M$  von 26°C bis 42°C, bevorzugt von 30°C bis 38°C, beträgt.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Wärmeäquivalent  $WE$  von 90 K· s bis 150 K· s beträgt.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die biologische Zelle ein gram-negativer Prokaryont wie *E. coli* oder ein Eukaryont wie  
20 *S. cerevisiae* ist und das Wärmeäquivalent  $WE$   $110 \pm 20$  K· s beträgt.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Zelle ein gram-positiver Prokaryont wie *B. subtilis* ist und das Wärmeäquivalent  $WE$   $130 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$  beträgt.

5 9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Kulturmedium ein flüssiges Medium ist und das thermische Konditionieren dadurch erfolgt, dass die die biologische Zelle enthaltende flüssige Medium in einer Kapillare fließt, wobei sich die Zelle für eine Konditionierzeit  $t_h$  innerhalb einer auf die Konditioniertemperatur  $T_K$  temperierten Kapillarstrecke der Kapillare befindet.

10 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Volumenstrom in der temperierten Kapillarstrecke von 0,5 ml/s bis 12 ml/s, bevorzugt von 2,5 ml/s bis 8,0 ml/s, beträgt.

15 11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Schritt der thermischen Konditionierung mit der Überführung des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmediums aus einem Kultivierungsgefäß, insbesondere einem Bioreaktor, in ein Auffanggefäß, insbesondere ein Probensammelgefäß, durchgeführt wird.

12. Verfahren zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

20 a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,

b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und

c) Isolieren des freigesetzten Inhaltsstoffs aus dem Kulturmedium.

13. Verfahren zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) quantitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs im Kulturmedium.

5 14. Verfahren zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) qualitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs im Kulturmedium.

10 15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Inhaltsstoff ein intrazellulärer Metabolit, ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, Aminen und deren Derivate, der Carboxylsäuren, der Alkohole, der Aldehyde, der Ketone, der Phosphatester (ohne die Nukleinsäuren), der Nukleinsäuren und verwandter Verbindungen, der Zucker und verwandter Verbindungen, der Lipide, der Steroide, der Fettsäuren, der Vitamine, der Coenzyme und der anorganischen Ionen ist.

16. Zellkonditionierzvorrichtung zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle in einem flüssigen Kulturmedium, insbesondere nach dem Verfahren nach Anspruch 9, mit mindestens einer an einer Wärmequelle (4) angeordneten und vom flüssigen Kulturmedium durchflossenen Kapillare (3),

5 dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare (3) einen Innendurchmesser von 0,5 mm bis 4,5 mm, bevorzugt von 1,0 mm bis 3,0 mm, aufweist und entlang einer temperierten Kapillarstrecke von 50 cm bis 1550 cm, bevorzugt von 90 cm bis 420 cm, der Kapillare mit der Wärmequelle (4) in Kontakt steht.

10 17. Zellkonditionierzvorrichtung nach Anspruch 16, wobei für ein zu übertragendes Wärmeäquivalent von 70 Ks bis 300 Ks zweckmäßigerweise eine Länge der temperierten Kapillarstrecke von etwa 80 cm bis etwa 1510 cm gewählt wird, wobei

15 a) für einen kleinen Volumenstrom von etwa 2,5 ml/s

i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 0,5 mm,

ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 2 mm und

20 b) für einen großen Volumenstrom von etwa 8 ml/s

i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 1 mm,

ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 4 mm

beträgt.

18. Zellkonditioniervorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, wobei die Zellkonditioniervorrichtung als Probennahmeverrichtung zur Entnahme einer Probe aus einer Quelle (1) eines die Zelle enthaltenden flüssigen Kulturmediums (2) ausgebildet ist und zusätzlich eine Probenüberführungsstrecke (5) und eine Probensammelvorrichtung (6) aufweist.  
5
19. Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 12 durchgeführt wird.
20. Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 13 durchgeführt wird.  
10
21. Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 14 durchgeführt wird.  
15

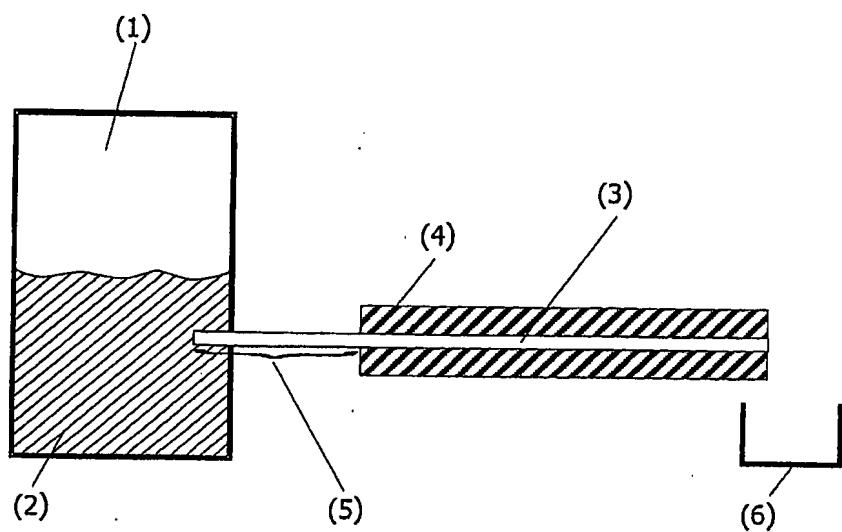
# Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte  
European Patent Attorneys  
European Trademark Attorneys

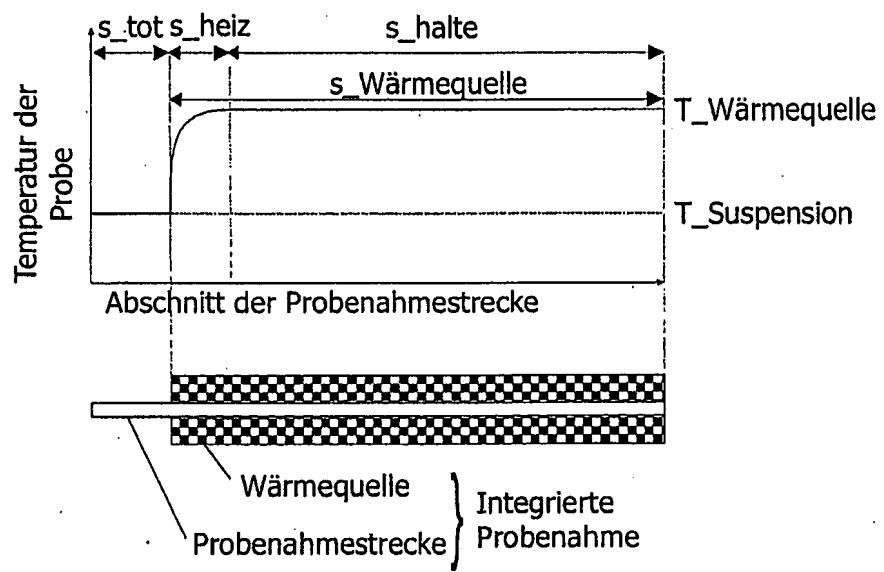
Intellectual Property Law  
Technology Law

## Zusammenfassung:

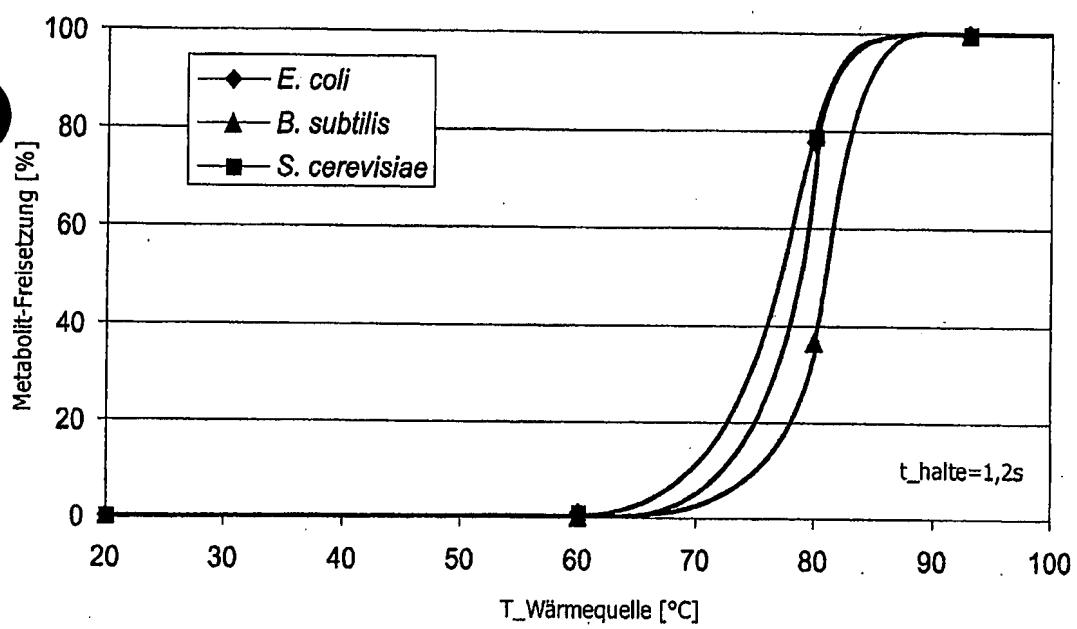
Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, Verfahren und Verwendungen dieser Mittel zur Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und dem 5 quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe sowie ein Probennahmeverfahren, welches in einem einzigen Schritt die Überführung einer Probe biologischer Zellen aus einem Kulturmedium und die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe bei der Überführung vorsieht, und Vorrichtungen zur Durchführung der Probennahme.



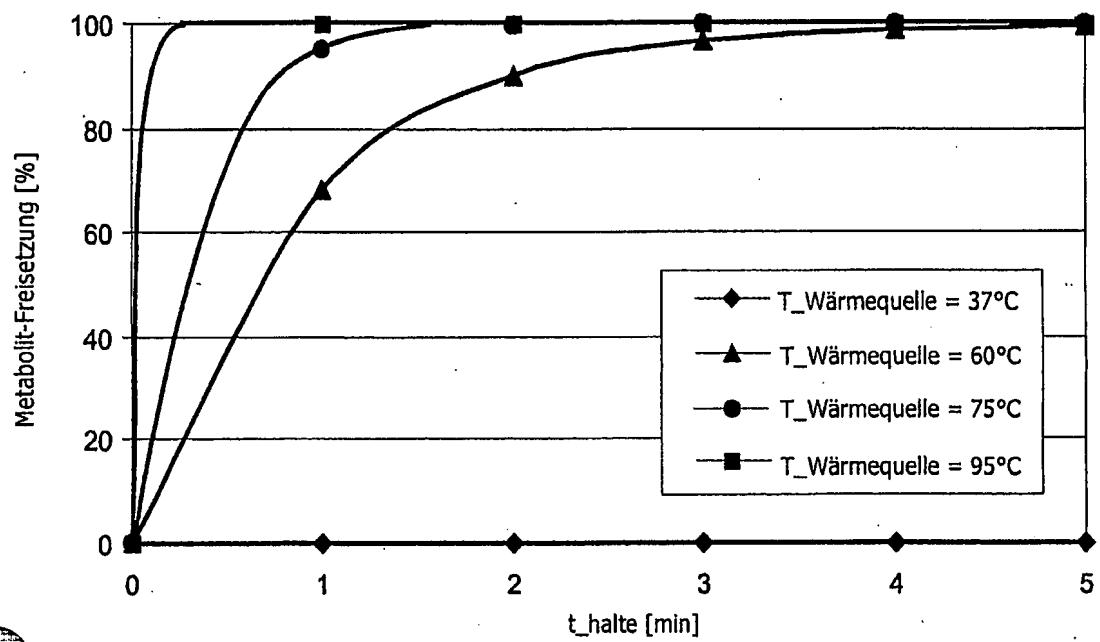
**Figur 1**



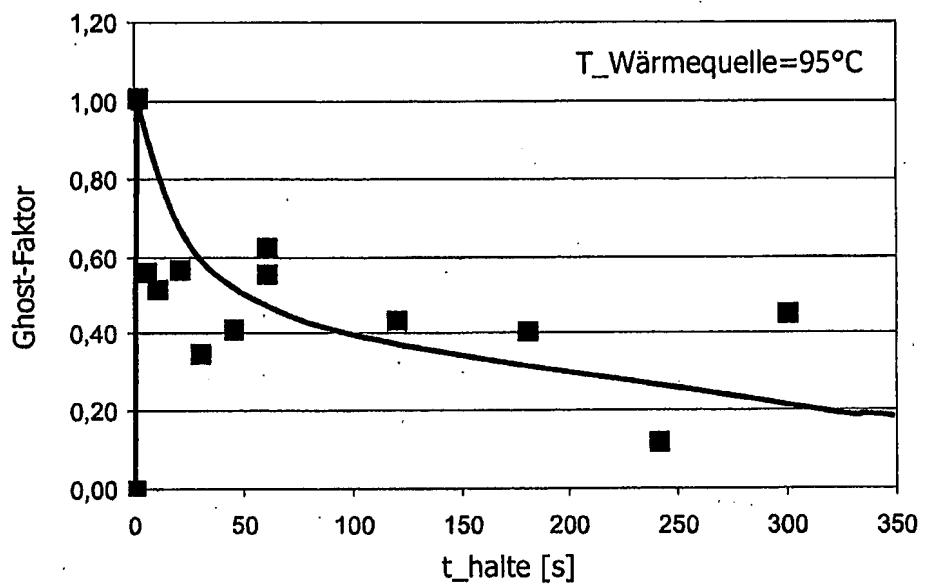
Figur 2



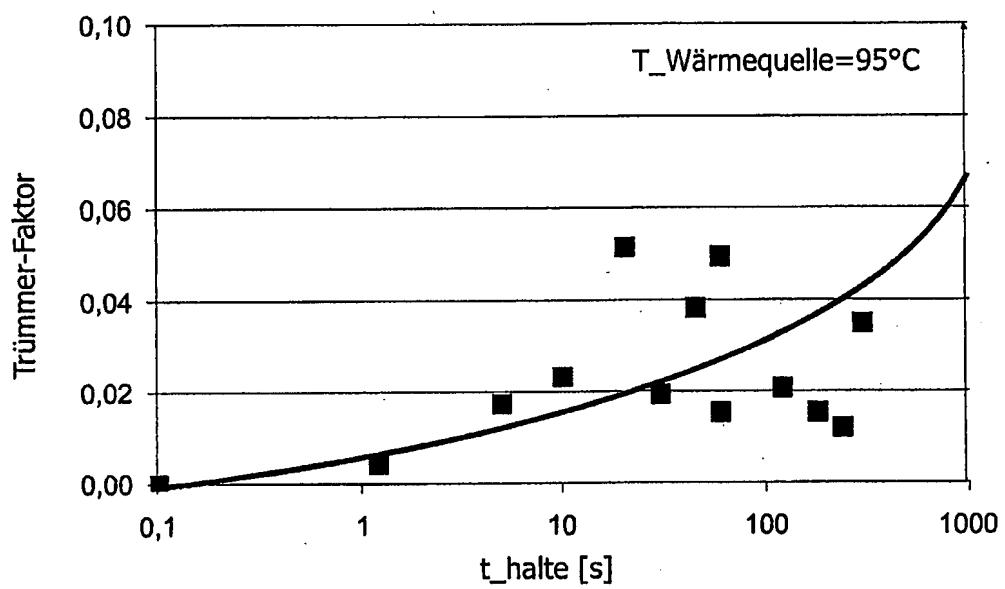
Figur 3



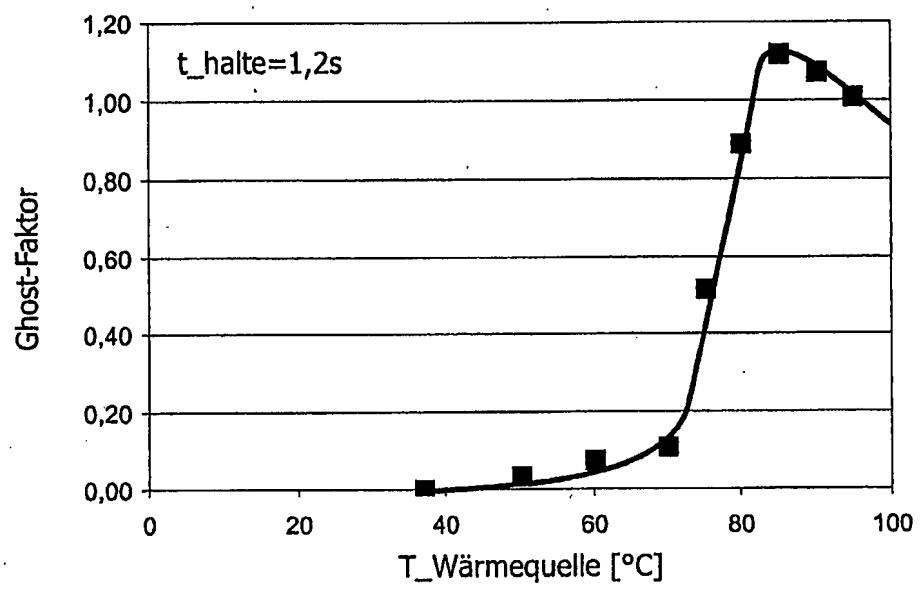
Figur 4



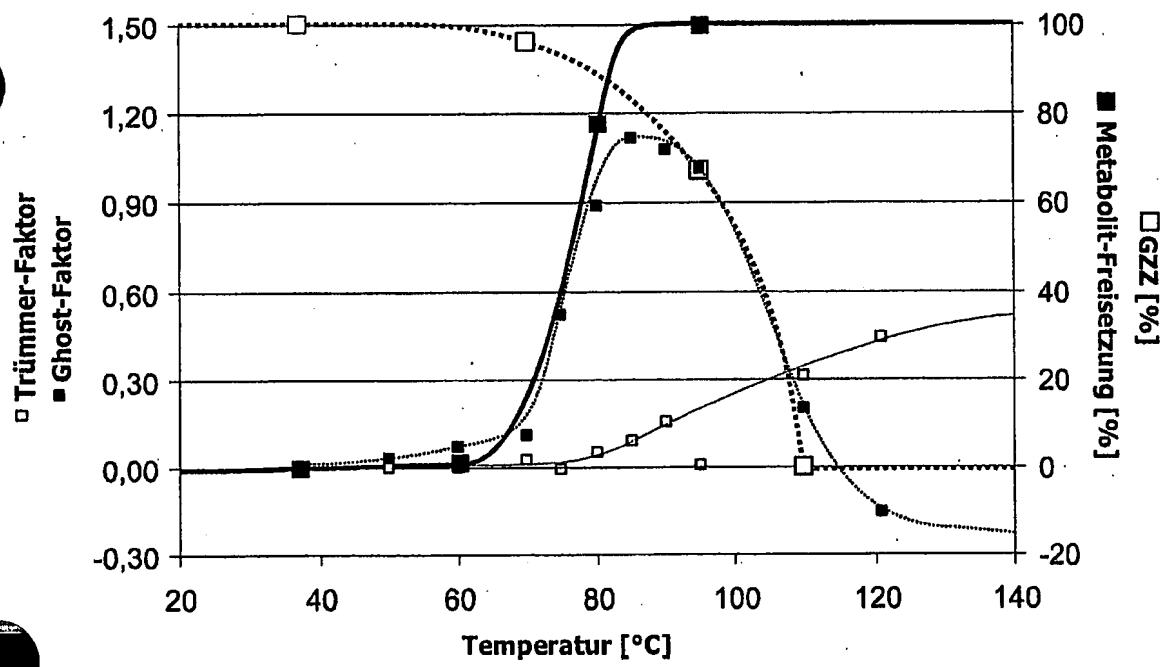
Figur 5



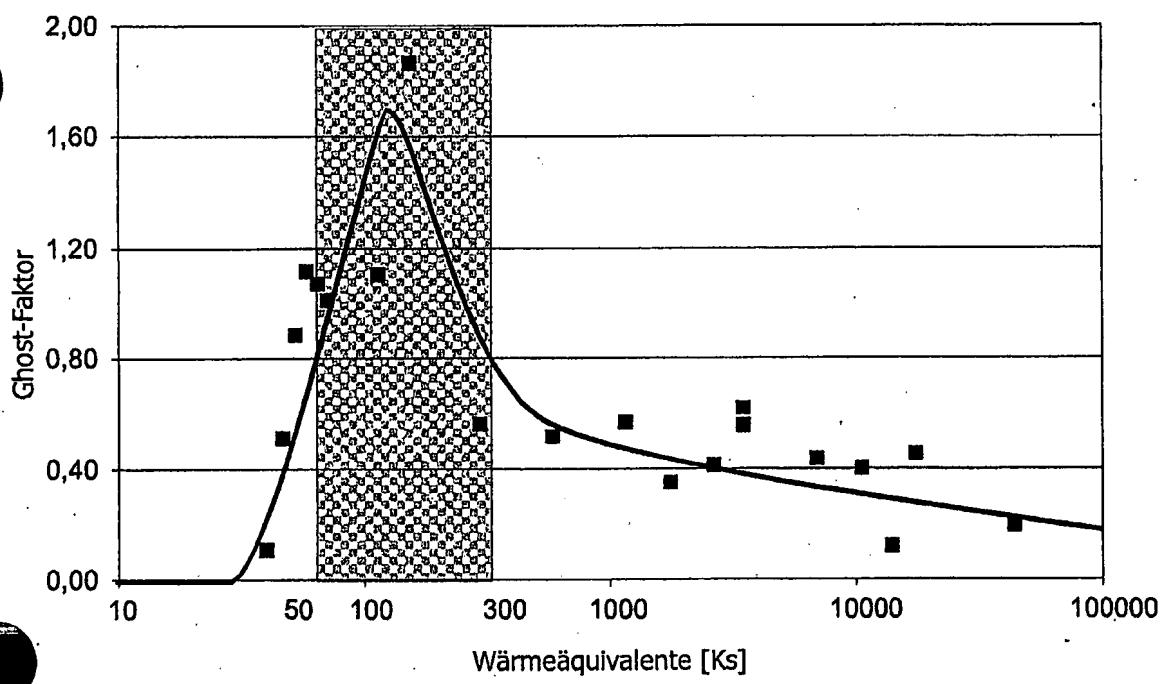
Figur 6



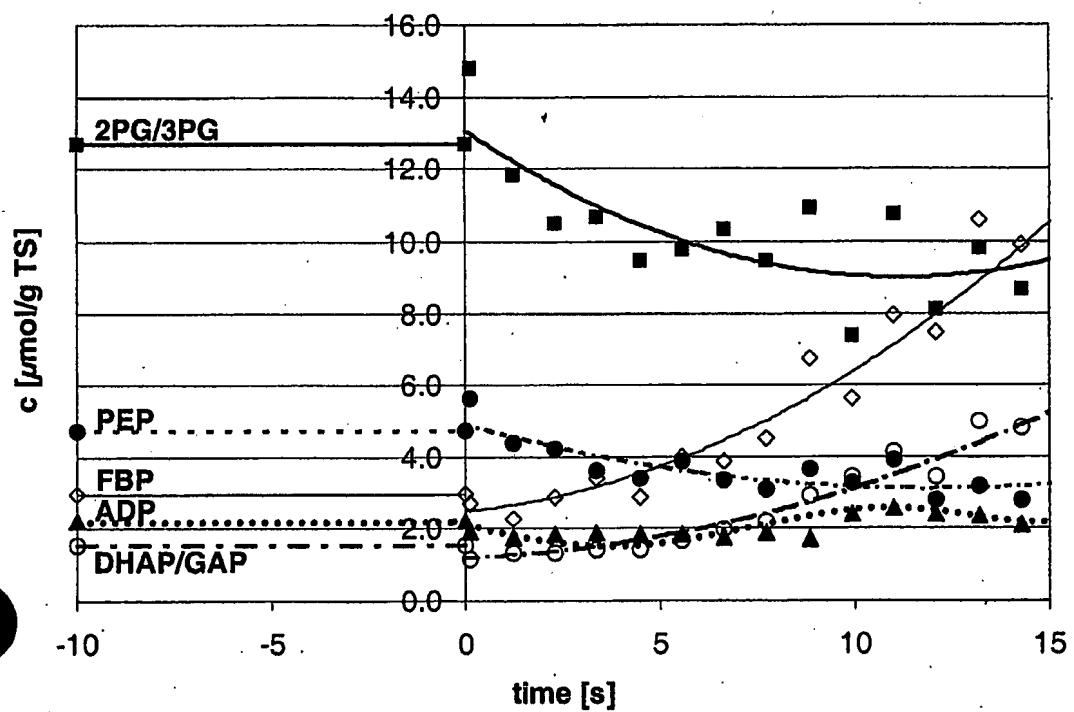
Figur 7



Figur 8



**Figur 9**



Figur 10